

**EFEK ANTI INFLAMASI EKSTRAK SIMPLISIA DAUN SUKUN (*Artocarpus
altilis* (Park.)) PADA MENCIT (*Mus musculus*) JANTAN YANG DIINDUKSI
KARAGENAN**

SKRIPSI

Oleh :

NUKE ARIANDINI

NIM. 115100100111032



JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

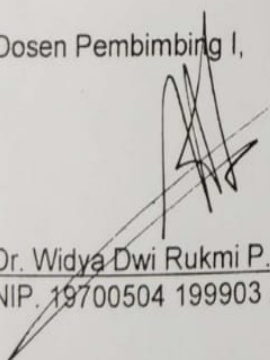
2018

LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Tugas Akhir : Efek Anti Inflamasi Ekstrak Simplisia Daun Sukun
(*Artocarpus altilis* (Park.)) Pada Mencit (*Mus musculus*)
Jantan yang Diinduksi Karagenan


Nama Mahasiswa : Nuke Ariandini
NIM : 115100100111032
Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Pembimbing I,


Dr. Widya Dwi Rukmi P., STP, MP
NIP. 19700504 199903 2 002

Tanggal Persetujuan:

Dosen Pembimbing II,


Nur Ida Panca N., STP, MP
NIP. 19860810 201504 2 004

Tanggal Persetujuan:

:

LEMBAR PENGESAHAN

Judul Tugas Akhir : Efek Anti Inflamasi Ekstrak Simplisia Daun Sukun
(*Artocarpus altilis* (Park.)) Pada Mencit (*Mus musculus*)
Jantan yang Diinduksi Karagenan

Nama Mahasiswa : Nuke Ariandini
NIM : 115100100111032
Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Penguji I,

Prof. Dr. Teti Estiasih, STP, MP
NIP. 19701226 200212 2 001

Dosen Pembimbing I,

Dr. Widya Dwi Rukmi P., STP, MP
NIP. 19700504 199903 2 002

Dosen Pembimbing II,

Nur Ida Panca N., STP, MP
NIP. 19860810 201504 2 004



Ketua Jurusan,

Prof. Dr. Teti Estiasih, STP, MP
NIP. 19701226 200212 2 001

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama Mahasiswa : Nuke Ariandini
NIM : 115100100111032
Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas : Teknologi Pertanian
Judul Tugas Akhir : Efek Anti Inflamasi Ekstrak Simplisia Daun Sukun
(*Artocarpus altilis* (Park.)) Pada Mencit (*Mus musculus*)
Jantan yang Diinduksi Karagenan

Menyatakan bahwa,

Skripsi dengan judul di atas merupakan karya asli penulis tersebut di atas.
Apabila di kemudian hari terbukti pernyataan ini tidak benar, saya bersedia
dituntut sesuai hukum yang berlaku.

Malang, Agustus 2018
Pembuat Pernyataan,

Nuke Ariandini
NIM. 115100100111032

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan pada tanggal 14 April 1993 di Malang, Jawa Timur. Penulis merupakan anak kedua dari dua bersaudara pasangan Bapak Aryoso dan Ibu Dewi Munifah. Saat ini penulis beralamatkan di Jalan Kendalsari VIII Alam Nirwana 3, Kota Malang, Jawa Timur.

Penulis telah menyelesaikan pendidikan di TK Islam Bumiayu Malang. Penulis melanjutkan pendidikan formal di SDN Bumiayu 2 Malang pada tahun 1999 dan lulus pada tahun 2005. Tahun 2005 penulis melanjutkan pendidikan di SMPN 21 Malang dan lulus pada tahun 2008. Tahun 2008 penulis melanjutkan pendidikan ke MAN 3 Malang dan lulus pada tahun 2011. Pada tahun yang sama penulis diterima menjadi mahasiswa Universitas Brawijaya melalui jalur SNMPTN di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Pada Tahun 2018 penulis telah berhasil menyelesaikan pendidikannya di Universitas Brawijaya Malang Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian.

NUKE ARIANDINI. 115100100111032. Efek Anti Inflamasi Ekstrak Simplisia Daun Sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) Pada Mencit (*Mus musculus*) Jantan yang Diinduksi Karagenan.

SKRIPSI.

Dosen Pembimbing I : Dr. Widya Dwi Rukmi Putri, STP, MP

Dosen Pembimbing II : Nur Ida Panca Nugrahini, STP, MP

RINGKASAN

Inflamasi atau radang merupakan respon pertahanan tubuh terhadap kerusakan sel ataupun jaringan yang disebabkan oleh berbagai rangsangan fisika, kimia, maupun mekanis. Saat ini masyarakat luas biasa menggunakan obat anti inflamasi non steroid (OAINS) untuk mengobati inflamasi tersebut. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa flavonoid dapat digunakan sebagai agen anti inflamasi. Daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) adalah salah satu tanaman sumber senyawa flavonoid yang dapat dimanfaatkan dengan optimal sebagai obat alternatif.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun sukun dalam menurunkan aktivitas inflamasi pada mencit dibandingkan dengan kontrol obat natrium diklofenak serta untuk mengetahui dosis optimal ekstrak simplisia daun sukun dalam menurunkan aktivitas inflamasi.

Pada penelitian ini, metode yang digunakan adalah Rancangan Tersarang (*Nested Design*) dengan dibagi menjadi 6 kelompok mencit, yaitu kontrol negatif, kontrol positif, kontrol obat, ekstrak dosis 15 mg/20 g BB, dosis 30 mg/20 g BB, dan dosis 60 mg/20 g BB. Data yang diperoleh dari analisis dengan menggunakan analisis ragam (ANOVA) dengan selang kepercayaan 95% yang dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh perlakuan yang diberikan. Jika hasil uji memperlihatkan adanya perbedaan nyata, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dan/atau *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada ekstrak simplisia daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) memiliki kandungan total flavonoid sebesar 43,16 mg/g ekstrak, total fenol 53,41 mgGAE/g, aktivitas antioksidan 70,18%, dan IC_{50} sebesar 76,21 ppm. Sedangkan uji *in vivo* menunjukkan bahwa pemberian ekstrak simplisia daun sukun mampu menurunkan aktivitas inflamasi pada mencit yang diinduksi karagenan 1% sebanyak 0,1 ml. Pemberian ekstrak simplisia daun sukun dosis 60 mg/20 g BB memiliki inhibisi edema yang terbaik dibandingkan dengan ekstrak dosis 15 mg/20 g BB dan ekstrak dosis 30 mg/20 g BB, serta kontrol obat natrium diklofenak.

Kata Kunci : Anti Inflamasi, *Artocarpus altilis* (Park.), *In vivo*, CD68, TNF- α

NUKE ARIANDINI. Anti-Inflammatory Effects of the Simplicia Leaf Extract of Breadfruit Plant (*Artocarpus altilis* (Park.)) in Male Mices (*Mus musculus*) Induced Carrageenan. 115100100111032.Thesis.

1st Advisor : Dr. Widya Dwi Rukmi Putri, STP, MP

2nd Advisor : Nur Ida Panca Nugrahini, STP, MP

SUMMARY

Inflammation is a response to tissue injury and infection in the body cells. In certain condition, the inflammation can cause danger to the patients. In general, the wider community using non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) to treat the inflammation. However, prolonged use of NSAIDs can have negative effects on the liver and kidneys of patients. Several studies in the last few years have shown that flavonoids can be used as an anti-inflammatory agent. Breadfruit plant (*Artocarpus altilis* (Park.)) is a plant flavonoid sources unexplored and utilized optimally.

The objective of this research is to determine the effect of the simplicia leaf breadfruit extract leaf in reducing inflammatory activity and to know optimal content of simplicia leaf extract breadfruit compared to diclofenac sodium as drug control in reducing inflammatory activity.

The method used was Nested Design with mice were divided into 6 groups, namely negative control, positive control, drug control, extract dose of 15 mg/20 g BW, extract dose of 30 mg/20 g BW and extract dose 60 mg/20 g BW. Data were statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA) confidence interval 95% are performed to determine whether or not the effect of a given treatment. If the test results showed significant differences, then continued with Least Significant Difference test (LSD) and / or Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

The results showed that the simplicia leaf breadfruit (*Artocarpus altilis* (Park.)) extract content of the total flavonoids 43.16 mg/g, total phenol 53.41 mgGAE/g, and IC₅₀ 76,21 µg/mL. While the in vivo tests showed that the simplicia leaf breadfruit extract able to reduce inflammatory activity in mices induced by 1% carrageenan as 0,1ml. Simplicia leaf breadfruit extract dose 60 mg/20 g BW have the best edema inhibition compared extract dose of 15 mg/20 g BW and a dose of 30 mg/20 g BW and control drug diclofenac sodium. On testing CD68, at a dose of extract showed significant differences among treatments.

Key Words : Anti-Inflammatory, *Artocarpus altilis* (Park.), *In vivo*, CD68, TNF- α

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya kepada penyusun sehingga penyusun dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul **“Efek Anti Inflamasi Ekstrak Simplisia Daun Sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) Pada Mencit (*Mus musculus*) Jantan yang Diinduksi Karagenan”** dengan baik.

Penyusunan Tugas Akhir ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian. Pada kesempatan kali ini penyusun ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Allah SWT atas segala hal
2. Kedua orang tua dan segenap keluarga yang selalu memberi dukungan moril maupun materil
3. Dr. Widya Dwi Rukmi Putri, STP, MP dan Nur Ida Panca Nugrahini, STP, MP selaku dosen pembimbing yang memberikan bimbingan, arahan, ilmu dan pengetahuan kepada penyusun
4. Prof. Dr. Teti Estiasih, STP, MP selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya
5. Satria, Fifi, Candra, Awa, Icha yang selalu membantu dan menyemangati penulis
6. Keluarga besar THP 2011
7. Dan semua pihak yang telah membantu sehingga skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Penulis berharap semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat kepada semua pihak yang memerlukannya.

Malang, Agustus 2018

DAFTAR ISI**RINGKASAN i****SUMMARY ii****KATA PENGANTAR iii****DAFTAR ISI iv****DAFTAR TABEL vii****DAFTAR GAMBAR viii****DAFTAR LAMPIRAN ix****I PENDAHULUAN 1**

- 1.1 Latar Belakang 1
- 1.2 Rumusan Masalah 2
- 1.3 Tujuan Penelitian 3
- 1.4 Manfaat Penelitian 3
- 1.5 Hipotesa Penelitian 3

II TINJAUAN PUSTAKA 5

- 2.1 Tanaman Sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) 5
- 2.2 Antioksidan 7
 - 2.2.1 Senyawa Fenol 9
 - 2.2.2 Flavonoid 11
- 2.3 Ekstraksi 12
- 2.4 Inflamasi 16
 - 2.4.1 Pengertian Inflamasi 16
 - 2.4.2 Mediator Inflamasi 18
 - 2.4.3 Mekanisme Inflamasi 22
 - 2.4.4 Mekanisme Karagenan sebagai Penyebab Inflamasi 23
 - 2.4.5 Mekanisme Obat Anti inflamasi 24
 - 2.4.6 Mekanisme Obat Natrium Diklofenak 27
- 2.5 Karagenan 27

2.6 Pengujian Efek Antiinflamasi	28
2.6.1 Model Inflamasi Akut	28
2.6.2 Model Inflamasi Kronik	29
2.7 Hewan Percobaan	30
2.8 Sitokin	30
2.9 Makrofag (CD68)	32
2.10 <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> (TNF- α)	33
2.11 Flowcytometry	35

III METODOLOGI PENELITIAN 37

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	37
3.2 Alat dan Bahan	37
3.2.1 Alat	37
3.2.1.1 Alat Ekstraksi Daun Sukun	37
3.2.1.2 Alat Analisa Ekstrak Daun Sukun	37
3.2.1.3 Alat Perawatan Hewan Coba	37
3.2.1.4 Alat Pengujian Aktivitas Inflamasi	38
3.2.2 Bahan	38
3.2.2.1 Bahan Ekstraksi Daun Sukun	38
3.2.2.2 Bahan Analisa Ekstrak Daun Sukun	38
3.2.2.3 Bahan Perawatan Hewan Coba	38
3.2.2.4 Bahan Pengujian Aktivitas Antiinflamasi	39
3.3 Metode Penelitian	39
3.3.1 Penelitian Tahap 1 : Ekstraksi Daun Sukun	39
3.3.2 Penelitian Tahap 2 : Pengujian Antiinflamasi Ekstrak Daun Sukun Secara <i>In Vivo</i>	39
3.3.3 Penelitian Tahap 3: Pengujian Analisa TNF- α	40
3.4 Pelaksanaan Penelitian	41
3.4.1 Pembuatan Ekstrak Daun Sukun	41
3.4.2 Analisa Ekstrak Daun Sukun	41
3.4.3 Pengujian <i>In Vivo</i> Ekstrak Daun Sukun sebagai Antiinflamasi	41
3.4.3.1 Masa Adaptasi Hewan Coba	42
3.4.3.2 Masa Pengkondisian Radang Pada Hewan Coba	42
3.4.3.3 Pengujian Edema pada Hewan Coba	42

3.4.3.4 Pengukuran Kadar CD68 dan TNF- α Metode <i>Flowcytometry</i>	43
3.4.4 Populasi dan Sampel Hewan Coba	44
3.4.5 Penentuan Besar Dosis Perlakuan	45
3.5 Analisis Data	45
3.6 Diagram Alir Penelitian	46
3.6.1 Tahap Pembuatan Ekstrak Daun Sukun	46
3.6.2 Pengujian Aktivitas Antiinflamasi	47
 IV HASIL DAN PEMBAHASAN	48
4.1 Ekstraksi Daun Sukun (<i>Artocarpus altilis</i> (Park.))	48
4.2 Kandungan Senyawa Bioaktif dan Aktivitas Antioksidan	49
4.2.1 Total Flavonoid	49
4.2.2 Total Fenol	51
4.2.3 Aktivitas Antioksidan dan IC ₅₀	53
4.3 Uji Aktivitas Antiinflamasi Secara <i>In Vivo</i>	55
4.3.1 Pengujian Edema pada Hewan Coba	55
4.3.2 Pengujian Kadar CD68 dan TNF- α dengan Metode <i>Flowcytometry</i>	64
 V KESIMPULAN DAN SARAN	69
5.1 Kesimpulan	69
5.2 Saran	69
 DAFTAR PUSTAKA	70
LAMPIRAN	80

DAFTAR TABEL

Nomor	Teks	Halaman
2.1	Perbandingan Ekstraksi Soxhlet dengan Ekstraksi Ultrasonik	15
2.2	Berbagai Aplikasi Ultrasonik	16
2.3	Perbandingan Inflamasi Akut dan Inflamasi Kronik	18
4.1	Hasil Analisis Ekstrak Daun Sukun	48
4.2	Hasil Uji Lanjut Total Flavonoid	50
4.3	Hasil Uji Lanjut Total Fenol	52
4.4	Hasil Uji Lanjut Aktivitas Antioksidan	55
4.5	Rerata Perubahan Persentase Edema	57
4.6	Hasil Uji Lanjut Rerata Edema yang Terbetuk Setiap Jam	60
4.7	Rerata Persentase Inhibisi Radang	62
4.8	Rerata Kadar TNF- α yang Dihasilkan Sel CD68	66

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Teks	Halaman
2.1	Tanaman Daun Sukun	5
2.2	Simplisia Daun Sukun	6
2.3	Kerangka C6-C3-C6 Flavonoid	11
2.4	Sumber-sumber Mediator Inflamasi	20
2.5	Mekanisme Pembesaran Pembuluh Darah Akibat Inflamasi	23
2.6	Biosintesis Prostaglandin	25
2.7	Ilustrasi Prinsip Kerja <i>Flowcytometer</i>	35
3.1	Diagram Alir Pembuatan Ekstrak Daun Sukun	46
3.2	Diagram Alir Pengujian Aktivitas Antiinflamasi	47
4.1	Grafik Rerata Persentase Edema	59
4.2	Grafik Rerata Persentase Inhibisi Radang	60
4.3	Grafik Rerata Sel Makrofag CD68	64
4.4	Grafik Representasi Uji CD68 TNF- α Menggunakan Alat <i>Flowcytometer</i>	66

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Teks	Halaman
1. Analisa Total Flavonoid	80	
2. Analisa Total Fenol	81	
3. Analisa Antioksidan	82	
4. Analisa Aktivitas Antioksidan Metode IC ₅₀	82	
5. Hasil Analisis Total Flavonoid	83	
6. Hasil Analisis Total Fenol	84	
7. Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan	85	
8. Hasil Analisis IC ₅₀	86	
9. Tabel Konversi Dosis	86	
10. Pengujian TNF- α dan CD68 Metode <i>Flowcytometry</i>	87	
11. Data Hasil Pengujian Aktivitas Antiinflamasi	88	
12. Analisis Ragam Aktivitas Antiinflamasi	91	
13. Data Uji CD68 dan TNF- α Metode <i>Flowcytometry</i>	92	
14. Grafik Pengujian CD68 dan TNF- α dengan <i>Flowcytometer</i>	94	
15. Dokumentasi Kegiatan	97	
16. Kode Etik Penelitian	98	

I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflamasi merupakan suatu respon jaringan terhadap rangsangan fisik atau kimiawi yang merusak. Rangsangan tersebut menyebabkan lepasnya mediator inflamasi seperti histamin, serotonin, bradikinin, dan prostaglandin yang menimbulkan reaksi radang berupa panas, nyeri, merah, bengkak, dan disertai gangguan fungsi (Katzung, 2004). Reaksi inflamasi ditandai dengan gejala seperti *rubor* (kemerahan), *kalor* (panas), *dolor* (nyeri), dan *turgor* (pembengkakan) (Corwin, 2008). Pengobatan pasien inflamasi pada umumnya untuk memperlambat atau membatasi proses kerusakan jaringan yang terjadi pada daerah inflamasi. Obat modern yang biasa digunakan untuk mengobati inflamasi adalah obat anti inflamasi non steroid (AINS). Tetapi penggunaan obat tersebut memiliki efek samping yang merugikan tubuh, seperti tukak lambung (Tjay dkk., 2002). Penggunaan obat AINS dalam jumlah tinggi juga dapat menyebabkan *tinnitus*, penurunan pendengaran dan vertigo (Katzung dkk., 2002). Oleh karena itu pemanfaatan tumbuhan obat dengan khasiat anti inflamasi perlu dilakukan untuk menemukan alternatif pengobatan dengan efek samping yang relatif lebih kecil.

Pengembangan obat anti inflamasi dari bahan alami telah banyak dilakukan. Penggunaan obat-obatan tradisional menjadi salah satu alternatif dalam pengobatan inflamasi yang dinilai lebih aman dari segi efek samping dan toksisitas (Awang, 2009). Berdasarkan penelitian Gautam dkk. (2009), diketahui bahwa agen anti inflamasi yang bersifat alami dapat diperoleh dari bahan alam yang mengandung golongan antioksidan, glukosamin, flavonoid, triterpenoids, alkaloids, *fatty acids*, steroids dan miscellaneous. Senyawa golongan flavonoid adalah yang paling banyak digunakan karena mempunyai peran biologi yang sangat beragam (Gautam dkk., 2009). Flavonoid merupakan pigmen tumbuhan dengan warna kuning, kuning jeruk, dan merah. Sekitar 5-10% metabolit sekunder tumbuhan adalah flavonoid (Macheix *et al.*, 1990). Kajian terhadap flavonoid banyak dilakukan tidak hanya karena peran biologinya, tetapi lebih karena potensinya sebagai obat (Ross dkk., 2002). Mekanisme kerja flavonoid sebagai anti inflamasi adalah dengan menghambat permeabilitas kapiler dan

menghambat metabolisme asam arakhidonat dan sekresi enzim lisosom dari sel neutrofil dan sel endothelial sehingga mengurangi terjadinya hipermeabilitas dan radang. Beberapa senyawa flavonoid dapat menghambat pelepasan asam arakhidonat dan sekresi enzim lisosom dari membran dengan jalan memblokir jalur siklooksigenase dan leukotriene yang merupakan mediator inflamasi (Pearson, 2005). Efek flavonoid sebagai antioksidan secara tidak langsung juga mendukung efek antiinflamasi. Adanya radikal bebas dapat menarik berbagai mediator inflamasi (Njiveldt *et al.*, 2001).

Beberapa contoh tanaman yang berfungsi sebagai agen antiinflamasi adalah daun duduk, kunyit, kumis kucing, lidah buaya, jambu biji, daun sukun, dan kemangi. Dalam penelitian ini tanaman yang digunakan sebagai obat antiinflamasi adalah daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)). Hal ini disebabkan karena khasiat daun sukun yang masih kurang dapat dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia sedangkan jumlahnya cukup melimpah sehingga memiliki peluang untuk dikembangkan sebagai obat antiinflamasi. Daun sukun mengandung senyawa flavonoid terprenilasi yaitu artocarpin yang mempunyai aktivitas antiinflamasi dan antikanker.

Penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun sukun dan besar dosis yang optimal dalam menurunkan aktivitas inflamasi pada mencit secara *in vivo*, serta efektifitas ekstrak daun sukun dibanding obat natrium diklofenak. Berdasarkan penelitian Ramadhani (2009), pengujian terhadap ekstrak daun sukun menunjukkan harga LC 50 (*Lethal Concentration* 50) sebesar 3608,893 µg/ml, sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak daun sukun tidak memiliki potensi toksisitas akut karena suatu senyawa dinyatakan mempunyai potensi toksisitas akut jika harga LC 50 kurang dari 1000 µg/ml. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mengenai ekstrak tanaman daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) sebagai agen antiinflamasi secara *in vivo*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, maka dapat dirumuskan masalah pada penelitian ini, yaitu:

1. Apakah pemberian ekstrak simplisia daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) dapat menurunkan aktivitas inflamasi pada mencit (*Mus musculus*) jantan yang diinduksi karagenan 1%?

2. Berapa dosis ekstrak simplisia daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) yang optimal dalam menurunkan aktivitas inflamasi pada mencit (*Mus musculus*) jantan yang diinduksi karagenan 1%?
3. Bagaimana efektifitas ekstrak simplisia daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) dalam menurunkan aktivitas inflamasi pada mencit (*Mus musculus*) jantan yang diinduksi karagenan dibandingkan natrium diklofenak?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak simplisia daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) dapat menurunkan aktivitas inflamasi pada mencit (*Mus musculus*) jantan yang diinduksi karagenan 1%.
2. Untuk mengetahui dosis ekstrak simplisia daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) yang optimal dalam menurunkan aktivitas inflamasi pada mencit (*Mus musculus*) jantan yang diinduksi karagenan 1%.
3. Untuk mengetahui efektifitas ekstrak simplisia daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) dalam menurunkan aktivitas inflamasi pada mencit (*Mus musculus*) jantan yang diinduksi karagenan dibanding natrium diklofenak.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai dosis dari ekstrak simplisia daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) yang optimal dalam menurunkan aktivitas inflamasi sehingga dapat menjadi agen antiinflamasi bagi penderita inflamasi akut.

1.5 Hipotesa Penelitian

1. Diduga ekstrak simplisia daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) berpengaruh terhadap penurunan aktivitas inflamasi pada mencit (*Mus musculus*) jantan yang diinduksi karagenan 1%.
2. Diduga pemberian ekstrak simplisia daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) dengan dosis 60 mg/20 g BB merupakan dosis optimal dalam

menurunkan aktivitas inflamasi pada mencit (*Mus musculus*) jantan yang diinduksi karagenan 1%.

3. Diduga ekstrak simplisia daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) lebih optimal dalam menurunkan aktivitas inflamasi pada mencit (*Mus musculus*) jantan yang diinduksi karagenan 1% dibandingkan natrium diklofenak.



II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Sukun (*Artocarpus altilis* (Park.))

Sukun merupakan spesies anggota suku *Moreceae*. Tanaman sukun banyak tumbuh di daerah tropis (Ragone, 1997). Sukun dapat tumbuh pada berbagai tipe tanah alluvial maupun daerah pantai (Massal dkk., 1954) tetapi paling cocok ditanam pada tanah liat yang berpasir dan banyak mendapatkan hujan dengan ketinggian 600-650 m di atas permukaan air laut hujan (Coronel, 1983). Tanaman ini mampu bertahan hidup di tanah yang gersang atau pada musim kering.

Sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Sub divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledoneae</i>
Bangsa	: <i>Urticales</i>
Suku	: <i>Moreceae</i>
Marga	: <i>Artocarpus</i>
Spesies	: <i>Artocarpus altilis</i> (Park.)



Gambar 2.1 Daun Sukun (Coronel, 1983)

Sukun merupakan tanaman yang berupa pohon tegak, berkayu, berakar tunggal, batangnya berbentuk bulat, dan memiliki percabangan simpodial. Tanaman sukun

berdaun tunggal yang tersebar, tepi daun bertoreh, ujung daun meruncing, pangkal daunnya membulat, memiliki petulangan daun menjari dengan permukaan licin, dan tulang daun menonjol. Buahnya berbentuk lonjong dengan permukaan bergigi tumpul yang tersusun teratur dan berwarna hijau. Buah ini dapat mengeluarkan getah. Bijinya berwarna coklat dan berbentuk lonjong dan pipih (Ragone, 1997).

Daun sukun mengandung beberapa zat berkhasiat seperti saponin, polifenol, asam hidrosianat, asetilkolin, tanin, riboflavin, dan fenol. Selain itu juga mengandung kuersetin, champorol, dan artoindonesianin. Senyawa artoindonesianin dan quercetin merupakan kelompok senyawa dari flavonoid (Harmanto, 2012). Flavonoid yang terkandung pada daun sukun tua, muda, serta tua menguning dan gugur masing-masing adalah 100,68 mg/g, 87,03 mg/g, dan 42,89 mg/g (Shabella, 2012). Sedangkan menurut Siddesha dkk. (2011), daun sukun mengandung tanin, fenolik, glikosida, saponin, steroid, terpenoid, dan antrakuinon. Ekstrak kloroform dari kulit akar sukun mengandung senyawa prenilflavonoid (Lin dkk., 2009; Ko dkk., 2005; Weng dkk., 2006). Ekstrak etil asetat daun sukun mengandung senyawa sitosterol dan flavonoid (Wang dkk., 2006). Fraksi etil asetat yang diisolasi dari ekstrak metanol daun sukun juga mengandung senyawa geranyl dihydrochalcone dan geranyl flavonoid (Wang dkk., 2007), sedangkan fraksi kloroformnya mengandung senyawa auron yaitu atilisin (Mai dkk., 2012).



Gambar 2.2 Simplisia Daun Sukun (Darma, 2013)

Tanaman sukun banyak dibudidaya untuk diambil buahnya dan dijadikan sebagai bahan makanan (Ragone, 1997). Getah dari tanaman sukun dapat

digunakan untuk mengobati diare, sakit perut, dan disentri. Daun sukun juga berkhasiat sebagai obat hipertensi, diabetes, dan rematik. Menurut Harmanto (2012), daun sukun mempunyai banyak manfaat untuk pengobatan yaitu sebagai antiinflamasi, antiplatelet, antioksidan, antiatherosklerosis, antinefritis, antimikroba, antidiabetes, sakit gigi, gatal-gatal, jantung, dan ginjal. Ekstrak daun sukun terbukti memiliki aktivitas antihipertensi sebagai inhibitor ACE (*Angiotensin Converting Enzyme*), antagonis α -adrenoreseptor dan mengeblok kanal kalsium (Shiddesa dkk., 2011). Ekstrak metanol daun sukun memiliki aktivitas sebagai antimikroba (Raman dkk, 2012). Menurut Mai dkk. (2012), senyawa geranyl aurone yang diisolasi dari daun sukun memiliki aktivitas sebagai inhibitor enzim tirosinase dan enzim α -glukosidase. Ekstrak etil asetat daun sukun menunjukkan adanya efek *cytoprotective* pada sel yang teroksidasi oleh adanya LDL (Wang dkk., 2006). Komponen fenolik dan geranyl flavonoid bersifat sitotoksik terhadap sel kanker (Arung dkk., 2009).

2.2 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang membantu menghambat berbagai reaksi oksidasi yang diakibatkan oleh radikal bebas, yang mencegah atau menunda kerusakan sel dan jaringan (Karthikumar *et al.*, 2007). Antioksidan juga merupakan senyawa yang mendonasikan satu atau lebih elektron kepada senyawa oksidan, kemudian mengubah senyawa oksidan menjadi senyawa yang lebih stabil. Antioksidan dapat mengeliminasi senyawa radikal bebas di dalam tubuh sehingga tidak menginduksi suatu penyakit (Kikuzaki *et al.*, 2002). Senyawa fenol tanaman merupakan senyawa metabolit sekunder dengan kemampuan yang menarik bagi kesehatan hewan maupun manusia. Efek dari molekul ini berhubungan dengan kemampuannya sebagai antioksidan, khususnya kemampuan untuk menangkap radikal bebas (*free radical scavenger*) pendonasian atom hidrogen atau elektron, atau untuk mengkelat kation logam. Senyawa fenol juga berkontribusi besar pada pembentukan warna dan karakteristik sensor pada buah dan sayuran, juga berperan dalam pertumbuhan dan proses reproduksi, dan perlindungan melawan pathogen dan predator (Meot-Duros dkk., 2009).

Antioksidan merupakan senyawa *neutraceuticals* yang memiliki banyak manfaat bagi kesehatan manusia. Senyawa antioksidan dapat melawan pengaruh bahaya dari radikal bebas yang terbentuk sebagai hasil metabolisme oksidatif, yaitu hasil dari reaksi-reaksi kimia dan proses metabolik yang terjadi di dalam tubuh (Rohmatussolihat, 2009). Salah satu metode yang banyak digunakan untuk menguji adanya aktivitas senyawa tersebut adalah dengan menggunakan metode DPPH. Metode ini menggunakan *1,1-Diphenyl-2-Picryl-Hydrazyl* sebagai radikal stabil yang dapat bereaksi dengan radikal lain membentuk senyawa yang stabil. Uji aktivitas antioksidan didasarkan pada prinsip bahwa antioksidan dalam produk akan mereduksi radikal bebas dalam DPPH yang menimbulkan perubahan warna larutan dari ungu menjadi kekuningan yang intensitasnya terukur secara spektrofotometri.

DPPH banyak digunakan untuk menguji kemampuan senyawa antioksidan dalam meredam radikal bebas atau donor hidrogen dan untuk menilai aktivitas antioksidan dalam bahan pangan. Metode DPPH dapat digunakan pada sampel padat maupun cair dan tidak untuk mengukur senyawa spesifik antioksidan, tetapi diaplikasikan untuk menduga kapasitas antioksidan total. Sehingga dengan mengukur kapasitas total antioksidan dapat diketahui sifat fungsional dari bahan pangan (Prakash, 2001).

Aktivitas antioksidan berhubungan dengan kandungan gugus hidroksil fenolik yang mampu menyumbangkan atom hidrogen ke radikal bebas untuk menetralkan sifat radikalnya (Hembing, 2008). Beberapa penelitian telah menjelaskan bahwa kandungan total fenol suatu bahan berbanding lurus dengan aktivitas antioksidannya. Senyawa golongan fenol diketahui sangat berperan terhadap aktivitas antioksidan, semakin besar kandungan senyawa golongan fenol maka semakin besar aktivitas antioksidan (Shahwar *et al.*, 2010). Beberapa penelitian menyebutkan korelasi antara total fenol dan aktivitas antioksidan yaitu korelasi yang kuat antara total fenol dan aktivitas antioksidan buah manggis sebesar 84%, pada tumbuhan daun hantap sebesar 99%, pada rambut jagung sebesar 93% (Hadriyono dkk., 2011).

Metode untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan dapat diklasifikasikan menjadi 3 kelompok. Metode pertama, metode tak langsung yaitu total phenols, Fe^{3+} -reduction, *ferric reducing antioxidant power* (FRAP), *Briggs-Rauscher reaction* (BRR) dan *methyl linoleate*. Metode kedua, mengukur metabolit dari oksidasi lipid

yaitu rancimat, *products volatile* dan *thiobarbituric acid* (TBA). Metode ketiga didasarkan pada kemampuan menangkap radikal yaitu total *radical-trapping antioxidant parameter* (TRAP), *oxygen radical absorbance capacity* (ORAC), 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfanote) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 19F NMR spectroscopy (Juliani dkk., 2002).

Metode pengujian DPPH bertujuan untuk mengukur kapasitas ekstrak terhadap penangkapan radikal 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) yang dibentuk dalam larutan oleh donasi atom hidrogen atau sebuah elektron. Jika ekstrak mempunyai kapasitas untuk menangkap DPPH *free radical* ditunjukkan dari larutan warna biru atau ungu berubah menjadi warna kuning karena pembentukan *diphenylpicrylhydrazine*. Reaksi ini digunakan untuk mengukur kemampuan ekstrak atau antioksidan untuk menangkap radikal bebas (Selmi dkk., 2008).

Radikal bebas adalah suatu bentuk molekul yang tidak stabil di dalam tubuh dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan (*unpaired electron*). Untuk mencapai kestabilan atom atau molekul, radikal bebas akan bereaksi dengan molekul disekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron disebut oksidan (*electron acceptor*) yaitu suatu senyawa yang dapat menerima elektron. Reaksi ini akan berlangsung terus menerus dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya (Maulida, 2010).

Uji daya antioksidan dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dimaksudkan untuk menguatkan aktivitas suatu senyawa uji sebagai antioksidan. Hal ini karena suatu senyawa uji menunjukkan daya antioksidan yang tinggi dengan salah satu metode, tidak selalu akan memberikan hasil yang sama baiknya dengan menggunakan metode lainnya sehingga disarankan untuk mengukur daya antioksidan dengan berbagai macam metode (Juliani dkk., 2002). DPPH merupakan radikal sintetik yang larut dalam pelarut polar seperti metanol dan etanol. DPPH merupakan radikal yang stabil, yang dapat diukur intensitasnya pada panjang gelombang 515 nm.

2.2.1 Senyawa Fenol

Fenol atau asam karbolat merupakan zat kristal tak berwarna dengan bau yang khas. Rumus kimia fenol yaitu C_6H_5OH yang memiliki gugus hidroksil (OH^-) yang berkaitan dengan cincin fenil. Fenol merupakan senyawa aromatik yaitu senyawa yang memiliki bau dan aroma khas. Titik didih dan kelarutan fenol sangat bervariasi. Hal ini tergantung pada sifat substituen yang menempel pada cincin benzena. Sifat senyawa fenol cenderung asam. Senyawa ini dapat melepaskan ion H^+ dari gugus hidroksil. Pengeluaran ion tersebut menjadikan anion fenoksida $C_6H_5O^-$ yang dapat dilarutkan dalam air dibandingkan dengan alkohol alifatik yang lain, fenol bersifat lebih asam (Wirakusumah, 2009).

Fenol adalah senyawa aromatik yang struktur kimianya diturunkan dari benzene, jika satu atau lebih atom *hydrogen* yang terikat pada inti benzene diganti dengan satu atau lebih gugus hidroksil. Polifenol merupakan salah satu kategori terbesar dari fitokimia dan paling banyak penyebarannya di antara kingdom tanaman. Senyawa golongan fenol diketahui sangat berperan terhadap aktivitas antioksidan, semakin besar kandungan senyawa golongan fenol maka semakin besar aktivitas antioksidannya (Kiessoun *et al.*, 2010). Mekanisme kerja antioksidan fenolik merupakan penangkap radikal yang poten. Senyawa fenolik suatu komponen aktif secara biologik, merupakan zat yang dapat menyumbang hidrogen ke radikal bebas dan bahkan memecah rantai reaksi oksidasi lipid pada tahap inisiasi awal (Gulcin dkk., 2004).

Senyawa polifenol atau fenolik adalah komponen bioaktif yang mempunyai aktivitas antioksidan yang secara alami terdapat pada sayuran dan buah-buahan, serta minuman seperti teh. Senyawa polifenolik terdiri atas beberapa subkelas yaitu flavonol, flavon, antasianidin, katekin, dan biflavan (Astawan, 2004). Senyawa golongan fenol diketahui sangat berperan terhadap aktivitas antioksidan, semakin besar kandungan senyawa golongan fenolnya maka semakin besar aktivitas antioksidannya (Shahwar *et al.*, 2010).

Fenol merupakan senyawa yang termasuk ke dalam kelompok metabolit sekunder yang berasal dari tumbuhan dan umumnya ditemukan pada vakuola sel. Fenol dan polifenol banyak ditemukan pada tumbuhan terutama buah-buahan, sayur-sayuran, dan biji-bijian. Fenol terdiri dari beraneka ragam struktur dengan ciri khas berupa cincin aromatik yang mengandung satu gugus hidroksil. Polifenol terdiri dari gabungan beberapa fenol. Salah satu golongan terbesar polifenol

adalah flavonoid, dan beberapa golongan bahan polimer penting lainnya antara lain adalah lignin dan melanin (Wirakusumah, 2009).

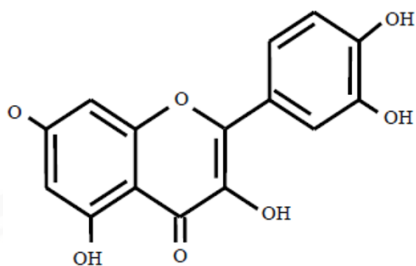
Senyawa fenol memiliki beberapa sifat, yaitu mudah larut dalam air, cepat membentuk kompleks dengan protein, dan sangat peka terhadap oksidasi enzim. Peranan beberapa golongan senyawa fenol dalam tumbuhan adalah sebagai berikut: 1) lignin sebagai bahan pembangun dinding sel; 2) antiosianin sebagai pigmen bunga; 3) flavonol berperan penting dalam pengaturan pertumbuhan tanaman kacang (*Pisum sativum*); 4) merupakan antioksidan *in vitro* yang kuat; dan 5) dipercaya penting bagi kesehatan manusia dengan asupan total polifenol sebesar 828 mg/hari. Fenol dan polifenol banyak ditemukan pada makanan, namun sampai saat ini belum ada ketentuan mengenai kandungan fenol dan polifenol total yang tepat dalam makanan. Sumber polifenol ada pada sayuran berwarna hijau dan buah-buahan termasuk buah manggis (Wirakusumah, 2009).

2.2.2 Flavonoid

Flavonoid adalah substansi yang berasal dari tumbuhan-tumbuhan (herbal). Flavonoid merupakan antioksidan yang potensial dan merupakan salah satu kelompok senyawa metabolik sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆. Flavonoid merupakan senyawa 15-karbon yang umumnya tersebar di seluruh dunia tumbuhan. Lebih dari 2000 flavonoid yang berasal dari tumbuhan telah diidentifikasi.

Kerangka flavonoid terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen dan bentuk teroksidasi cincin ini dijadikan dasar pembagian flavonoid ke dalam sub-sub kelompoknya. Sistem penomoran digunakan untuk membedakan posisi karbon di sekitar molekulnya (Cook dkk., 1996). Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam, berada dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon (Cuppet *et al.*, 1954). Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa C₆-C₃-C₆.

Artinya, kerangka karbonnya terdiri dari atas dua gugus C₆ (cincin benzene tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga-karbon.



Gambar 2.3 Kerangka C₆ – C₃ – C₆ Flavonoid (Robinson, 1995)

Flavonoid sering terdapat sebagai glikosida. Golongan terbesar flavonoid berciri mempunyai cincin piran yang menghubungkan rantai tiga -karbon dengan salah satu dari cincin benzene (Robinson, 1995). Telah banyak penelitian yang dilaksanakan tentang penggunaan senyawa flavonoid. Flavonoid mampu menghambat fase biosintesis prostaglandin yang melalui jalur COX-2 (Middleton *et al.*, 2000).

Senyawa flavonoid terdistribusi secara luas pada tanaman, memiliki berbagai fungsi dan kontribusi yang penting dalam kesehatan manusia, seperti sebagai antioksidan, anti peradangan, anti alergi, dan dapat menghambat oksidasi dari LDL (*Low Density Lipoprotein*). Secara umum, efek yang paling penting dari flavonoid adalah menangkap radikal bebas. Keberadaan flavonoid akan menstabilkan *reactive oxygen species* (ROS) dengan cara berkaitan dengan senyawa reaktif. Hal ini dikarenakan reaktivitas yang tinggi dari komponen hidroksil pada flavonoid dapat menyebabkan radikal bebas menjadi inaktif (Njiveldt *et al.*, 2001).

Beberapa senyawa flavonoid yang terdapat di dalam makanan diantaranya adalah kuersetin, kaempferol, luteolin, myricetin, dan katekin. Quercetin adalah salah satu jenis flavonoid yang umumnya merupakan komponen terbanyak dalam tanaman, kemudian diikuti kaempferol dan myricetin (Lee, 2000).

2.3 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu metode pemisahan zat atau senyawa tertentu yang diinginkan dari bahan asalnya. Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Terdapat beberapa metode dalam ekstraksi bahan alam. Jenis ekstraksi bahan alam adalah ekstraksi secara panas dengan cara refluks dan penyulingan uap air dan ekstraksi secara dingin dengan cara maserasi, perkolasi dan alat soxhlet.

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut. Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan.

Ekstraksi pelarut menyangkut distribusi zat terlarut (solut) di antara dua fasa cair yang tidak bercampur. Posisi zat-zat terlarut antara dua cairan yang tidak dapat bercampur menawarkan banyak kemungkinan yang menarik untuk pemisahan analisis. Beberapa metode ekstraksi senyawa organik bahan alam yang umum digunakan antara lain (Darwis, 2000):

1. Maserasi

Maserasi merupakan proses perendaman sampel pelarut organik yang digunakan pada suhu ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstrak senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut. Secara umum pelarut metanol merupakan pelarut yang paling

banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena dapat melarutkan seluruh golongan metabolit sekunder. Prinsip dari ekstraksi maserasi adalah penyarian zat aktif yang dilakukan dengan cara merendam serbuk dalam cairan penyari yang sesuai selama sehari atau beberapa pada suhu kamar terlindung dari cahaya, cairan penyari akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel. Larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah (proses difusi). Peristiwa tersebut berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Selama proses maserasi dilakukan pengadukan dan penggantian cairan penyari setiap hari. Endapan yang diperoleh dipisahkan dan filtratnya dipekatkan. Keuntungan dari metode ini ialah peralatannya yang sederhana, sedangkan kerugiannya adalah waktu yang diperlukan untuk mengekstrak sampel cukup lama, cairan penyari yang digunakan lebih banyak, tidak dapat digunakan untuk bahan-bahan yang mempunyai tekstur keras seperti benzoin, tiraks, dan lilin.

2. Perkolasi

Perkolasi merupakan proses melewati pelarut organik pada sampel sehingga pelarut akan membawa senyawa organik bersama-sama pelarut. Tetapi efektifitas dari proses ini hanya akan lebih besar untuk senyawa organik yang sangat mudah larut dalam pelarut yang digunakan.

3. Sokletasi

Menggunakan soklet dengan pemanasan dan pelarut akan dapat dihemat karena terjadinya sirkulasi pelarut yang selalu membasahi sampel. Proses ini sangat baik untuk senyawa yang tidak terpengaruh oleh panas.

4. Destilasi Uap

Proses destilasi lebih banyak digunakan untuk senyawa organik yang tahan pada suhu cukup tinggi, yang lebih tinggi dari titik didih pelarut yang digunakan. Pada umumnya lebih banyak digunakan untuk minyak atsiri.

5. Refluks

Penarikan komponen kimia yang dilakukan dengan cara sampel dimasukkan ke dalam labu alas bulat bersama-sama dengan cairan penyari lalu

dipanaskan. Uap-uap cairan penyari akan terkondensasi pada kondensor bola menjadi molekul-molekul. Cairan penyari yang akan turun kembali menuju labu alas bulat, akan menyari kembali sampel yang berada pada labu alas bulat. Demikian seterusnya proses ekstraksi akan berlangsung secara berkesinambungan sampai penyarian sempurna. Penggantian pelarut dilakukan sebanyak 3 kali setiap 3-4 jam. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan. Keuntungan dari metode ini adalah digunakan untuk mengekstraksi sampel-sampel yang mempunyai tekstur kasar dan tahan pemanasan langsung. Kerugiannya adalah membutuhkan volume total pelarut yang besar.

Firdaus *et al.* (2010) menyelidiki bahwa teknik ekstraksi konvensional yang digunakan selama bertahun-tahun yang lalu membutuhkan banyak waktu dan pelarut, sehingga memiliki tingkat efisiensi yang rendah (Soni *et al.*, 2010). Kebanyakan produk alam yang tidak stabil secara *thermal* akan terdegradasi dengan menggunakan teknik ini, karena berdasarkan pada pemilihan jenis pelarut yang tepat serta penggunaan sejumlah panas dan/atau agitasi untuk meningkatkan kelarutan dan laju perpindahan massanya. Teknik yang biasa digunakan adalah maserasi, perkolasi, hydrodistilasi dan soxhlet (Péres *et al.*, 2006).

Berdasarkan kenyataan tersebut, maka perlu adanya tuntutan terhadap teknik ekstraksi baru guna meminimalkan keterbatasan teknik ekstraksi konvensional. Hal tersebut bertujuan supaya komponen target yang terekstrak pada matrik tanaman menjadi lebih efisien. Sebagai jawaban dari tuntutan tersebut, Soni *et al.* (2010) menawarkan beberapa alternatif baru, seperti ekstraksi fluida superkritik, ekstraksi solven akselerasi, ekstraksi ultrasonik dan *microwave* untuk mengekstrak senyawa fitokimia dari tanaman.

Sejumlah hasil penelitian menunjukkan bahwa penerapan teknik intensitas ultrasonik mampu mengekstrak senyawa fitokimia, seperti alkaloid, flavonoid, polisakarida, protein dan minyak esensial dari berbagai bagian tanaman dan bibit tanaman (Firdaus *et al.*, 2010). Ekstraksi ultrasonik dapat menyebabkan gangguan fisik baik pada dinding maupun membran sel biologis serta penurunan ukuran partikel. Efek tersebut berdampak pada penetrasi pelarut yang lebih baik terhadap material sel yang pada akhirnya akan meningkatkan laju perpindahan massa pada

jaringan serta memfasilitasi perpindahan senyawa aktif dari sel ke pelarut (Novak *et al.*, 2008).

Proses isolasi dan pemurnian senyawa fitokimia dengan teknik ekstraksi konvensional kurang efisien. Penggunaan ultrasonik sejak 1950-an telah mampu meningkatkan hasil ekstraksi pada skala laboratorium. Perbandingan soxhlet dan ekstraksi ultrasonik disajikan pada Tabel 2.1 (Soni *et al.*, 2010).

Tabel 2.1 Perbandingan Ekstraksi Soxhlet Versus Ekstraksi Ultrasonik

Deskripsi	Ekstraksi Soxhlet	Ekstraksi Ultrasonik
Waktu ekstraksi	3 – 48 jam	10 – 60 menit
Ukuran sampel	1 – 30 gram	1 – 30 gram
Penggunaan pelarut	100 – 500 ml	30 – 200 ml
Investasi	Rendah	Rendah
Keuntungan	Tidak membutuhkan filtrasi	Multiple ekstraksi

Sumber: Soni *et al.* (2010)

Ultrasonik adalah salah satu bentuk dari energi yang dihasilkan gelombang suara dengan frekuensi di atas deteksi telinga manusia, yaitu antara 20 kHz – 500 MHz. Hal tersebut menyebabkan ultrasonik dapat diaplikasikan pada rentang disiplin yang cukup luas. Berbagai aplikasi ultrasonik yang disusun berdasarkan pada frekuensi dan intensitas suara dapat dilihat pada Tabel 2.2. Ultrasonik pada intensitas rendah dan frekuensi tinggi, biasanya diaplikasikan untuk evaluasi non-destruktif, sebaliknya pada intensitas tinggi dan frekuensi rendah merupakan jenis ultrasonik untuk aplikasi sonokimia.

Salah satu manfaat metode ekstraksi ultrasonik adalah untuk mempercepat waktu ekstraksi (Kuldiloke, 2002). Hal ini dibuktikan dengan penelitian Cameron dkk., (2006) tentang ekstraksi pati jagung yang menyebutkan rendemen pati jagung yang didapat dari proses ultrasonik selama 2 menit adalah sekitar 55,2-67,8% hampir sama dengan rendemen yang didapat dari pemanasan dengan air selama 1 jam yaitu 53,4%. Hal ini dikarenakan ekstraksi menggunakan ultrasonik menyebabkan efek mekanik, yaitu penetrasi pelarut ke dalam jaringan bahan

menjadi lebih besar, sehingga kandungan yang ada didalamnya dapat keluar dengan mudah (Santos *et al.*, 2006).

Tabel 2.2 Berbagai Aplikasi Ultrasonik

	Frekuensi Rendah (20 kHz – 1 MHz)	Frekuensi Tinggi (1 – 10 MHz)
Intensitas rendah	Sonophoresis	Medical diagnosis
Intensitas tinggi	Welding, cleaning, cell disruption, lithotripsy, engineering application, sonochemistry	Massage therapy, drug delivery

Sumber: Santos *et al.* (2006)

Metode ekstraksi ultrasonik memiliki kelebihan, yaitu sederhana, cepat, murah, dan efisien. Ultrasonik juga memberikan efek mekanik sehingga penetrasi pelarut ke dalam jaringan bahan menjadi lebih besar dan meningkatkan kontak luas permukaan antara bahan dan pelarut. Menurut Santos *et al.* (2006), gelombang ultrasonik akan memutus struktur jaringan serta meningkatkan suhu dan tekanan. Hal tersebut yang membuat efisiensi ekstraksi meningkat.

2.4 Inflamasi

2.4.1 Pengertian Inflamasi

Inflamasi merupakan sebuah reaksi kompleks dari sistem imun tubuh pada jaringan vaskuler yang menyebabkan akumulasi dan aktivasi leukosit serta protein plasma yang terjadi pada saat infeksi, keracunan maupun kerusakan sel. Inflamasi pada dasarnya merupakan sebuah mekanisme pertahanan terhadap infeksi dan perbaikan jaringan, namun terjadinya inflamasi secara terus-menerus juga dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan bertanggungjawab pada mekanisme beberapa penyakit (Abbas dkk., 2005).

Terdapat empat kunci utama terjadinya inflamasi yaitu kemerahan, demam, bengkak, dan adanya rasa sakit di area terjadinya inflamasi (Coussens dkk., 2002). Proses inflamasi merupakan respon tubuh dalam melindungi, menghilangkan, dan menetralkan jaringan tubuh dari benda-benda asing yang membahayakan tubuh. Selain itu proses ini juga akan memperbaiki jaringan agar kembali ke keadaan semula dan tidak mempengaruhi fungsi dari jaringan yang terserang benda asing. Selama terjadi inflamasi akan terjadi perubahan patofisiologis yaitu dimana aliran darah akan meningkat menuju organ atau jaringan yang mengalami inflamasi, jumlah dari leukosit juga akan meningkat yang diawali dengan neutrofil kemudian makrofag dan limfosit keluar dari pembuluh darah menuju jaringan sekitar terjadinya inflamasi dan selanjutnya akan menuju pada organ atau jaringan yang mengalami inflamasi (Sherwood, 2002).

Inflamasi terjadi pada dua tahap, yaitu inflamasi akut dan inflamasi kronik. Inflamasi akut merupakan tahap awal terjadinya inflamasi ditengahi melalui aktivasi pada sistem imun, kemudian untuk sebuah periode pendek dan biasanya dianggap sebagai unsur-unsur pengobatan inflamasi. Respon inflamasi akut terjadi dalam beberapa jam atau beberapa hari. Sehingga imun dalam tubuh beserta leukosit berada pada aliran darah dalam menetralkan terjadinya inflamasi. Proses inflamasi akut melibatkan tiga komponen, yaitu vaskuler yang akan berubah karena adanya peningkatan aliran darah; mikrovaskuler yang akan mengalami perubahan struktur untuk memungkinkan bagi leukosit dan protein plasma untuk meninggalkan sirkulasi; adanya migrasi leukosit dari mikrosirkulasi dan berkumpul pada daerah yang mengalami jejas (Cruise *et al.*, 1991; Contran dkk., 2007 dalam Ayu, 2012).

Inflamasi kronik merupakan peradangan yang telah berlangsung dalam jangka waktu yang lama. Berbeda dengan inflamasi akut, inflamasi kronik ditandai dengan infiltrasi sel mononuclear (makrofag, limfosit, dan sel plasma) dan destruksi jaringan. Inflamasi kronik telah dihubungkan dengan sebagian besar penyakit kronik mencakup kanker, penyakit kardiovaskular, diabetes, obesitas, paru-paru, dan penyakit saraf.

Respon inflamasi terjadi karena dikeluarkannya mediator-mediator inflamasi yaitu histamin, bradikinin, serotonin, prostaglandin, dan leukotrin. Gejala yang ditunjukkan pada saat tubuh mengalami inflamasi yaitu kemerahan, pembengkakan, panas atau demam pada area inflamasi dan rasa sakit.

Kemerahan pada area inflamasi disebabkan darah akan berkumpul pada area terluka. Berkumpulnya darah disebabkan adanya pelepasan mediator kimia yaitu kinin, prostaglandin, dan histamin. Selain itu adanya kemerahan menunjukkan tahap awal terjadinya inflamasi. Berikut perbandingan antara inflamasi akut dan inflamasi kronik yang dapat dilihat pada **Tabel 2.3**.

Tabel 2.3 Perbandingan Inflamasi Akut dan Inflamasi Kronik

Tingkat Inflamasi	Peristiwa Utama Inflamasi	Sel Penanda
Inflamasi Akut	Produksi sitokin pada proinflamasi	TNF- α , IL-1 β , IL-6
	Sintesis pada komponen reaktan fase akut oleh <i>hepatocyte</i>	CRP, SAA, fibrinogen
	Lain-lain	MCP-1, oksidasi nitrit
	Ekspresi adesi molekul	VCAM-1, ICAM-1, E-selectin
Inflamasi Kronik	Microalbuminuria	uMA
	Stres nitrosatif	3-Nitrotyrosine
	Stres oksidatif	Urinary 8-OHdG
	Peroksidatif lipid	Phospholipase A2, Urinary F2, isoprostane, COX-2

Sumber: Sherwood (2002) dalam Ayu (2012)

2.4.2 Mediator Inflamasi

Inflamasi dimulai saat sel mast berdegranulasi dan melepaskan bahan-bahan kimianya seperti histamin, serotonin, dan bahan kimia lainnya. Histamin yang merupakan mediator kimia utama inflamasi juga dilepaskan oleh basophil dan trombosit. Akibat pelepasan histamin ini adalah vasodilatasi pembuluh darah sehingga terjadi peningkatan aliran darah dan terjadinya peningkatan permeabilitas kapiler pada awal inflamasi (Corwin, 2008).

Mediator lain yang dilepaskan selama respon inflamasi yaitu faktor kemotaktik neutrofil dan eosinofil, dilepaskan oleh leukosit (neutrofil dan eosinofil) yang dapat menarik sel-sel ke daerah cedera. Selain itu juga dilepaskan

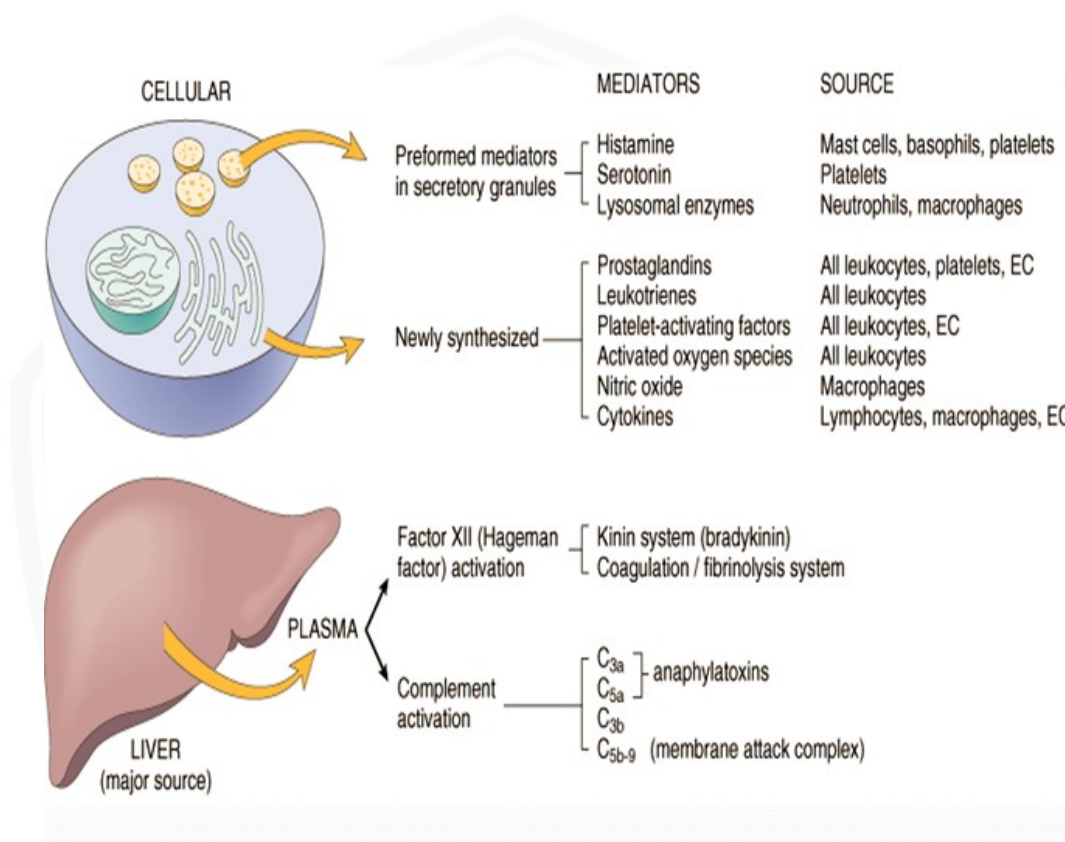
prostaglandin terutama dari seri E. Saat membran sel mengalami kerusakan, fosfolipid akan diubah menjadi asam arakhidonat yang dikatalisis oleh fosfolipase A2. Asam arakhidonat selanjutnya akan dimetabolisme oleh lipooksigenase dan siklooksigenase (COX). Pada jalur siklooksigenase, prostaglandin disintesis. Prostaglandin dapat meningkatkan aliran darah ke tempat yang mengalami inflamasi, meningkatkan permeabilitas kapiler, dan merangsang reseptor nyeri. Sintesis prostaglandin dapat dihambat oleh golongan obat AINS. Leukotrien merupakan produk akhir dari metabolisme asam arakhidonat pada jalur lipooksigenase. Senyawa leukotrien dapat meningkatkan permeabilitas kapiler selama cedera atau infeksi (Corwin, 2008).

Sitokin adalah mediator inflamasi yang lain, yaitu zat yang dikeluarkan oleh leukosit. Sitokin bekerja seperti hormon dengan merangsang sel-sel lain pada sistem imun untuk berproliferasi atau menjadi aktif selama infeksi dan inflamasi. Sitokin terdiri dari dua kategori yaitu yang bersifat pro-inflamasi dan anti-inflamasi. Sitokin pro-inflamasi antara lain interleukin-1 yang berasal dari makrofag dan monosit interleukin-2, interleukin-6, *tumor necrosis factor*, interferon gamma berasal dari aktivasi limfosit. Sitokin pro-inflamasi berperan dalam merangsang makrofag untuk meningkatkan fagositosis dan merangsang sumsum tulang untuk meningkatkan produksi leukosit dan eritrosit. Sitokin anti-inflamasi meliputi interleukin-4 dan interleukin-10 yang berperan dalam menurunkan sekresi sitokin pro-inflamasi. Selain itu juga terdapat kemokin, yaitu sejenis sitokin, bekerja sebagai agen kemotaksis yang meregulasi pergerakan leukosit. Kemotaksis adalah penarikan leukosit yang meliputi neutrofil dan monosit ke daerah cedera (Corwin, 2008). Salah satu mediator yang juga dilepaskan saat terjadi inflamasi adalah bradikinin. Bradikinin ini yang menyebabkan rasa nyeri, vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas kapiler (Eales, 2003).

Mediator yang banyak berperan pada proses inflamasi adalah prostaglandin dan leukotrien. Prostaglandin menyebabkan dilatasi pembuluh darah dan meningkatkan efek histamin dan bradikinin. Di dalam otak, prostaglandin dibentuk sebagai reaksi terhadap pirogen-pirogen yang berasal dari bakteri (infeksi). Prostaglandin ini menstimulir pusat regulasi kalor di hipotalamus dan merangsang terjadinya demam. Sedangkan leukotrien menstimulasi migrasi dari leukosit ke jaringan (Eales, 2003). Leukotrien memperbesar mobilitas dan fungsi leukosit

sehingga mereka tertarik oleh zat-zat kemotatik yang dalam jumlah besar menginvasi daerah peradangan dan mengakibatkan banyak gejala radang (Tjay dkk., 2002).

Berdasarkan jenisnya, mediator inflamasi dibagi menjadi 2 yaitu mediator lokal yang disintesis secara lokal oleh sel di tempat inflamasi dan mediator sistemik yang bisa bersirkulasi di dalam plasma dan disintesis oleh hati (Gurenlian, 2006). Dua jenis mediator tersebut dapat dilihat pada **Gambar 2.4**.



Gambar 2.4 Sumber-Sumber Mediator Inflamasi (Abrams, 1995)

Mediator-mediator inflamasi yang terbentuk akan menghasilkan serangkaian perubahan pada jaringan yang mengalami kerusakan tersebut yang dimanifestasikan dengan lima tanda kardinal inflamasi, yaitu (Price, 2005):

- Kemerahan (Eritema)

Eritema merupakan salah satu dari lima tanda kardinal inflamasi dan merupakan hal pertama yang terlihat di daerah yang mengalami peradangan. Saat reaksi peradangan mulai timbul, arteriol yang menyuplai daerah tersebut melebar, dengan demikian banyak darah mengalir ke dalam mikrosirkulasi lokal. Kapiler-kapiler yang sebelumnya kosong atau hanya sebagian yang meregang dengan cepat terisi penuh dengan darah. Keadaan ini dinamakan hiperemia atau kongesti, menyebabkan warna merah lokal karena peradangan akut. Timbulnya hiperemia pada permulaan reaksi peradangan akut diatur oleh tubuh baik secara neurogenik maupun secara kimia, melalui pengeluaran zat seperti histamin.

b. Nyeri (Dolor)

Rasa nyeri dari reaksi peradangan dapat dihasilkan dengan berbagai cara. Nyeri yang timbul adalah akibat tekanan cairan pada ujung saraf. Pengeluaran zat kimia tertentu seperti histamin atau zat kimia bioaktif lainnya dapat merangsang saraf. Selain itu, pembengkakan jaringan yang meradang mengakibatkan peningkatan tekanan lokal yang dapat menimbulkan rasa sakit.

c. Panas (Kalor)

Kalor atau panas terjadi bersamaan dengan eritema dari reaksi peradangan akut. Daerah peradangan pada kulit menjadi lebih panas dari sekelilingnya karena darah yang disalurkan tubuh ke permukaan daerah yang mengalami peradangan lebih banyak daripada yang disalurkan ke daerah normal.

d. Pembengkakan (Turgor)

Pembengkakan ditimbulkan oleh adanya distribusi cairan dan sel-sel dari sirkulasi darah ke jaringan interstisial. Campuran dari cairan dan sel yang tertimbun di daerah peradangan disebut eksudat. Pada reaksi peradangan akut, sebagian besar eksudat adalah cair, kemudian sel-sel darah putih atau leukosit meninggalkan aliran darah, tertimbun sebagai bagian dari eksudat.

e. Perubahan Fungsi (*Functio Laesa*)

Pada bagian yang bengkak, nyeri disertai sirkulasi abnormal, dan lingkungan kimiawi lokal yang abnormal terjadi perubahan fungsi yang abnormal, namun penyebab perubahan fungsi pada daerah yang mengalami peradangan tersebut belum diketahui secara jelas.

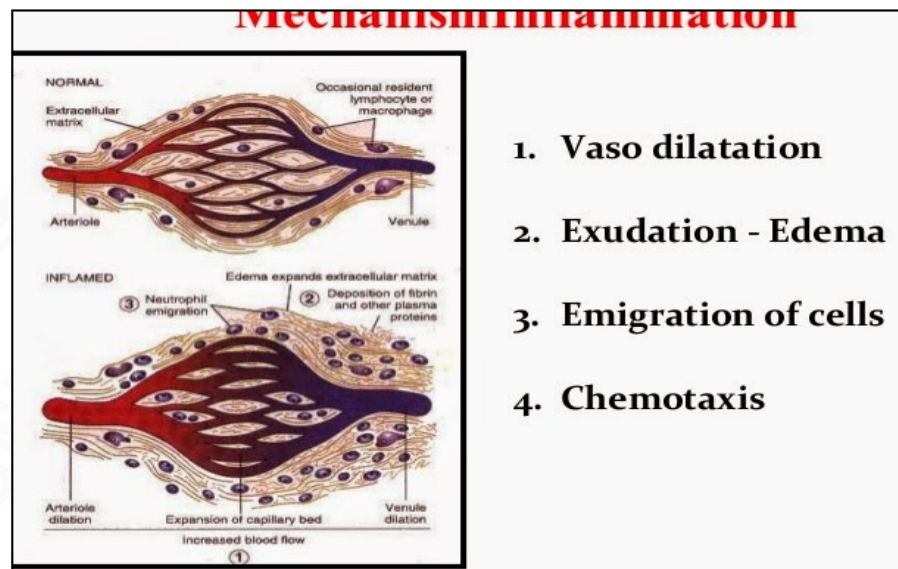
2.4.3 Mekanisme Inflamasi

Respon peradangan diawali oleh adanya trauma, virus, bakteri, jamur yang menyebabkan tubuh terluka atau cedera. Pada daerah yang luka, mula-mula terjadi vasokonstriksi pembuluh darah arteri. Selanjutnya dalam beberapa detik terjadi vasodilatasi diikuti dengan pembukaan pada katup pembuluh kapiler. Vasodilatasi pembuluh darah arteri dan pembukaan pembuluh darah kapiler menyebabkan peningkatan aliran darah ke daerah luka, sehingga menyebabkan warna kemerahan dan panas. Akibat vasodilatasi dan peningkatan aliran darah terjadi peningkatan tekanan hidrostatik intravaskuler yang menyebabkan filtrasi cairan meningkat dari kapiler dan dihasilkan cairan yang mengandung sedikit protein dari filtrasi plasma darah yang disebut transudasi. Pembentukan transudasi kemudian diikuti dengan peningkatan permeabilitas dinding pembuluh darah yang menyebabkan keluarnya cairan yang kaya protein (eksudat) ke interstitial. Keluarnya protein dari plasma mengurangi tekanan osmotik intravaskuler dan meningkatkan tekanan osmotik cairan interstitial. Akibatnya terjadilah aliran cairan keluar dari intravaskuler ke jaringan interstitial sehingga terjadi edema (Robbins dkk., 2005).

Perubahan yang terjadi pada beberapa jam pertama setelah terjadinya cedera atau invasi meliputi tiga komponen, yakni (1) perubahan ukuran diameter pembuluh darah akibat meningkatnya laju aliran darah; (2) peningkatan permeabilitas kapiler yang memicu eksudasi cairan kaya protein dan edema lokal; serta (3) agregasi leukosit dari sirkulasi ke dalam jaringan ekstrasvaskuler (Contran dkk., 2007 dalam Ayu, 2012).

Respon vaskuler pada daerah cedera jaringan merupakan sesuatu yang mendasar untuk reaksi radang akut karena tanpa pasokan darah yang memadai, jaringan tidak dapat memberikan reaksi radang. Reaksi perubahan vaskuler pada diameter pembuluh darah berupa vasokonstriksi sementara yang lalu diikuti oleh vasodilatasi (Contran dkk., 2007). Jaringan yang rusak menstimulasi sel mast untuk mengeluarkan histamin, yang merupakan mediator kimiawi yang berperan dalam vasodilatasi. Dilatasi arteriol dan venil serta terbukanya beberapa pembuluh

darah kecil yang mana sebelumnya membawa sedikit darah menyebabkan meningkatnya aliran darah ke tempat terjadinya cedera dapat meningkat hingga 10 kali lipat (Robbins dkk., 2005). Dengan meningkatnya jumlah darah ke tempat cedera dapat menjelaskan terjadinya kemerahan dan peningkatan suhu (Ayu, 2012). Perubahan pembuluh darah yang membesar akibat proses inflamasi dapat dilihat pada **Gambar 2.5** berikut.



Gambar 2.5 Mekanisme Pembesaran Pembuluh Darah Akibat Inflamasi (Robbins dkk., 2005)

2.4.4 Mekanisme Karagenan sebagai Penyebab Inflamasi

Karagenan merupakan suatu zat asing (antigen) yang bila masuk ke dalam tubuh akan merangsang pelepasan mediator inflamasi seperti histamin sehingga menimbulkan inflamasi akibat antibodi tubuh bereaksi terhadap antigen tersebut untuk melawan pengaruhnya. Mediator inflamasi yang pertama adalah histamin dan serotonin, diikuti fase kedua, yaitu pelepasan kinin yang mempertahankan peningkatan kepermeabelan pembuluh darah. Kemudian fase ketiga yaitu

pelepasan prostaglandin yang bersamaan dengan migrasi leukosit ke lokasi radang (Hamor, 1996).

Mekanisme karagenan sebagai pro-inflamasi yaitu merangsang lisisnya sel mast yang merupakan salah satu agen terpenting penyebab respon inflamasi, dan melepaskan mediator-mediator radang yang dapat mengakibatkan vasodilatasi sehingga menimbulkan eksudasi dinding kapiler dan migrasi fagosit ke daerah radang sehingga terjadi pembengkakan pada daerah tersebut. Pada pembentukan edema karagenan akan menginduksi cedera sel dengan melepaskan mediator kimia yang mengawali proses terjadinya inflamasi. Edema yang terbentuk akan bertahan selama 6 jam dan akan berangsur-angsur menurun selama 24 jam (Corsini dkk., 2005). Ada tiga fase pembentukan udem yang diinduksi oleh karagenan. Fase pertama adalah pelepasan histamin dan serotonin yang berlangsung hingga 90 menit. Fase kedua adalah pelepasan bradikinin yang terjadi 1,5 hingga 2,5 jam setelah induksi. Fase ketiga terjadi pelepasan prostaglandin pada 3 jam setelah induksi (Morris, 2003).

Pada penelitian sebelumnya, yang berperan dalam proses pembentukan edema adalah prostaglandin intermediet yang terbentuk melalui proses biosintesis prostaglandin (Vinegar dkk., 2004). Edema yang disebabkan oleh injeksi karagenan diperkuat dengan dikeluarkannya mediator inflamasi terutama PGE1 dan PGE2 dengan cara menurunkan permeabilitas vaskuler. Apabila permeabilitas vaskuler turun maka protein-protein plasma dapat menuju ke jaringan yang luka sehingga terjadi edema (Corsini dkk., 2005).

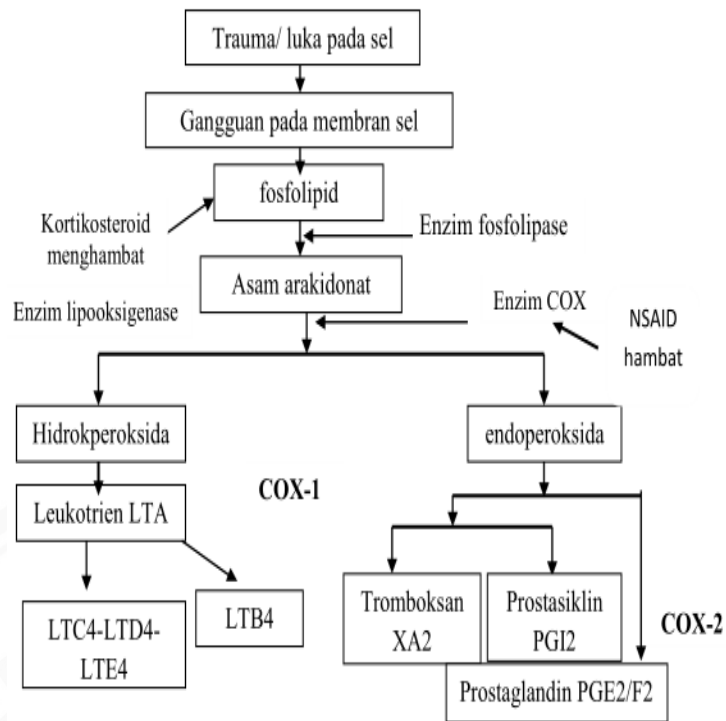
2.4.5 Mekanisme Obat Anti Inflamasi

Inflamasi yang mengakibatkan nyeri pada bagian tubuh tertentu yang mengalami cedera dapat dihilangkan dengan penggunaan obat antiinflamasi yang bersifat AINS (Anti Inflamasi Non Steroid). Obat AINS merupakan obat yang terbuat dari bahan aktif, secara farmakologi tidak homogen dan bekerja untuk menghambat prostagladin serta dimanfaatkan untuk pengobatan nyeri akut dan kronik (Fajriani, 2008). Pengobatan menggunakan obat AINS memiliki dua tujuan yaitu untuk meringankan rasa nyeri yang merupakan gejala awal terjadinya

inflamasi dan untuk memperlambat dan membatasi kerusakan jaringan akibat inflamasi tersebut (Furst dkk., 2002).

Selain berperan sebagai antiinflamasi, obat golongan AINS mempunyai khasiat sebagai analgetik dan antipiretik. Obat AINS dikelompokkan berdasarkan sifat dan struktur kimianya, tingkat keasaman, ketersediaan awalnya dan berdasarkan selektifitas hambatannya pada penemuan dua bentuk enzim COX-1 (constitutive cyclooxygenase-1) dan COX-2 (inducible cyclooxygenase-2) yaitu enzim yang berperan dalam pembentukan asam arakhidonat yang menjadi mediator prostaglandin (Fajriani, 2008). Sifat kimia dan struktur obat AINS menentukan distribusinya di dalam tubuh, hal ini akan memberikan pengaruh yang berbeda-beda pada setiap jenis karena setiap obat AINS memiliki perbedaan struktur kimia. Secara umum obat AINS merupakan jenis obat yang bersifat asam lemah dengan pka 3-5 dan larut dalam lemak menembus susunan syaraf pusat sehingga mampu memberikan efek yang sentral lebih besar. Sifat asam yang dimiliki oleh obat AINS membuatnya lebih banyak ditemukan pada sel-sel yang berdekatan dengan suasana asam seperti di lambung dan area inflamasi.

AINS menghambat siklooksigenase (COX) sehingga konversi asam arakhidonat menjadi prostaglandin, prostasiklin, dan tromboksan yang berperan dalam menimbulkan reaksi peradangan menjadi terganggu. Tetapi AINS tidak menghambat biosintesis leukotrien yang diketahui ikut berperan dalam proses inflamasi (Wilmana, 1995). Biosintesis prostaglandin secara singkat dapat dilihat pada **Gambar 2.6**.



Gambar 2.6 Biosintesis Prostaglandin (Wilmana, 1995)

Siklooksigenase terdapat dalam 2 bentuk, yaitu COX-1 dan COX-2. COX-1 penting dalam pertahanan fisiologi tubuh serta pemeliharaan berbagai organ dan jaringan khususnya ginjal, saluran cerna, dan trombosit. Jika aktivitas COX-1 dihambat oleh AINS maka akan timbul efek samping pada berbagai organ dan jaringan tersebut. Sedangkan jika aktivitas COX-2 dihambat oleh AINS maka inflamasi akan berkurang (Wilmana, 1995). Hal tersebut dapat terjadi karena COX-2 berperan penting dalam biosintesis prostaglandin yang terlibat dalam reaksi inflamasi dan timbulnya rasa nyeri akibat reaksi inflamasi (Wilmana, 1995).

Berdasarkan mekanisme penghambatan siklooksigenase, AINS dikelompokkan menjadi AINS non-selektif dan AINS selektif penghambat COX-2. AINS selektif penghambat COX-2 antara lain aspirin, indometasin, diflunisal, celecoxib, dan valdecoxib. AINS selektif penghambat COX-2 terbukti kurang menyebabkan gangguan saluran cerna dibanding AINS non-selektif, namun secara klinis AINS selektif belum terbukti lebih efektif dari AINS non-selektif (Wilmana, 1995).

Salah satu golongan obat AINS yang sering digunakan untuk mengatasi inflamasi dan nyeri adalah natrium diklofenak. AINS derivat fenil asetat tersebut memiliki aktivitas analgesik dan antipiretik serta memiliki potensi efek antiinflamasi kuat dengan efek samping iritasi terhadap saluran cerna yang lebih rendah jika dibandingkan dengan indometasin, naproxen, dan piroxikam. Obat ini sering digunakan untuk mengatasi radang pada penyakit karena arthritis (Lelo, 2005).

Diklofenak diabsorpsi cepat dan sempurna setelah pemberian oral, konsentrasi plasma obat ini tercapai dalam 2-3 jam. Pemberian bersama makanan akan memperlambat laju absorpsi tetapi tidak mengubah jumlah yang diabsorpsi. Bioavailabilitasnya sekitar 50% akibat metabolisme lintas pertama yang cukup besar. Obat ini 99% terikat pada protein plasma dan waktu paruhnya berada pada rentang 1-3 jam. Diklofenak diakumulasi di cairan sinovial setelah pemberian oral. Hal tersebut menjelaskan bahwa efek terapi di sendi jauh lebih panjang daripada waktu paruhnya. Dosis untuk radang akibat arthritis adalah 100-150 mg sehari terbagi dalam 2 atau 3 dosis (Wilmana, 1995). Diklofenak dimetabolisme dalam hati oleh enzim *iso enzim sitokrom* menjadi *hidroksidiklofenak*. Hasil metabolit tersebut diekskresi dalam urin (65%) dan empedu (35%). Efek yang paling umum ditimbulkan oleh diklofenak adalah efek saluran cerna, pendarahan, dan pembentukan *ulcer* atau perforasi dinding usus (Robert dkk., 2001).

Timbulnya gejala inflamasi dapat dicegah atau ditekan oleh kortikosteroid. Mekanisme kerjanya adalah menghambat aktivitas fosfolipase sehingga mencegah pelepasan awal asam arakhidonat yang diperlukan untuk aktivasi jalur enzim berikutnya. Hal ini menyebabkan sintesis prostaglandin, tromboksan, prostasiklin, maupun leukotrien terganggu. Disamping itu, kortikosteroid juga dapat mengurangi gejala inflamasi dengan efek vaskularnya yaitu vasokonstriksi. Vasokonstriksi adalah penurunan permeabilitas kapiler dengan mengurangi jumlah histamin yang dilepaskan oleh basofil dan menghambat fungsi fagositosis leukosit dan makrofag jaringan (Katzung dkk., 2002).

2.4.6 Mekanisme Obat Natrium Diklofenak

Natrium diklofenak merupakan obat golongan AINS (Anti Inflamasi Non Steroid). Obat ini merupakan COX-inhibitor non selektif yang bekerja dengan

menghambat enzim siklooksigenase (COX). Enzim siklooksigenase berperan dalam produksi sejumlah zat kimia dalam tubuh, salah satunya prostaglandin. Prostaglandin ini diproduksi oleh tubuh sebagai respon dari cedera sehingga saraf akan lebih sensitif terhadap rasa nyeri. Dengan menghalangi kerja enzim COX, prostaglandin lebih sedikit diproduksi, yang berarti rasa sakit dan peradangan akan mereda (Lelo, 2005). Secara umum, natrium diklofenak bekerja dengan menghambat enzim COX tidak secara selektif, yaitu menghambat COX-1 dan COX-2, sehingga menghasilkan penghambatan sintesis prostaglandin yang merupakan mediator inflamasi (Wilmana, 1995).

2.5 Karagenan

Karagenan merupakan senyawa polisakarida sulfat yang diperoleh dari ekstraksi tanaman rumput laut dari family *Chondrus*, *Gigartina*, dan *Eucheuma*. Bentuk karagenan yaitu berupa serbuk putih hingga kuning kecoklatan, ada yang berbentuk butiran kasar hingga serbuk halus, tidak memiliki bau dan dapat memberikan rasa yang berlendir pada lidah. Berdasarkan kandungan sulfatnya dan potensi karagenan dalam pembentukan gel, karagenan dibagi menjadi tiga jenis yaitu lambda, iota, dan kappa karagenan (Rowe dkk., 2009).

Karagenan mampu membuat inflamasi karena karagenan merupakan polisakarida sulfat dengan molekul besar yang mampu menimbulkan jejas jaringan atau inflamasi apabila diinduksikan pada mencit. Jejas jaringan tersebut mampu menimbulkan gangguan pada membran sel yang memicu asam arakhidonat mengeluarkan mediator-mediator inflamasi seperti prostaglandin dan leukotrien. Leukotrien dikeluarkan dari jalur lipoxygenase dan prostaglandin dikeluarkan dari jalur cyclooxygenase (COX). Selain itu trauma jaringan juga memicu mediator-mediator pro-inflamasi seperti IL-1, TNF- α dan NO. Mediator-mediator tersebut mampu menyebabkan peningkatan permeabilitas kapiler yang selanjutnya membuat keluarnya cairan pembuluh darah ke jaringan interstitial, dan akhirnya menyebabkan peningkatan cairan ekstrasvaskuler yang disebut dengan edema (Contran dkk., 2007 dalam P. Ayu 2012).

Karagenan yang digunakan sebagai induksi inflamasi adalah karagenan jenis kappa karena mudah untuk diperoleh dan dapat menimbulkan udem yang berarti.

Karagenan dipilih karena dapat melepaskan prostaglandin setelah disuntikkan ke hewan uji. Oleh karena itu, karagenan dapat digunakan sebagai iritan dalam metode uji yang digunakan untuk mencari obat-obat antiinflamasi, tepatnya yang bekerja dengan menghambat sintesis prostaglandin. Penggunaan karagenan sebagai penginduksi radang memiliki beberapa keuntungan, antara lain: tidak meninggalkan bekas, tidak meninggalkan kerusakan jaringan dan memberikan respon yang lebih peka terhadap obat antiinflamasi dibanding senyawa iritan lainnya (Winter dkk., 1962).

2.6 Pengujian Efek Anti Inflamasi

Aktivitas antiinflamasi suatu bahan obat adalah kemampuan obat dalam mengurangi atau menekan derajat udem yang dihasilkan oleh induksi hewan uji. Ada beberapa teknik pengujian yang telah diperkenalkan untuk mengevaluasi efek antiinflamasi. Perbedaannya terletak pada bahan penginduksinya, baik kimia, fisika, maupun menggunakan *adjuvant Freud*, yaitu larutan yang berisi *mycobacterium* yang telah mati. Metode yang diketahui hingga saat ini terdiri dari dua model, yaitu model inflamasi akut dan model inflamasi kronik.

2.6.1 Model Inflamasi Akut

Beberapa metode yang dapat digunakan untuk uji model inflamasi akut, diantaranya (Suralkar, 2008):

a. Induksi Karagenan

Induksi udem dilakukan pada kaki hewan uji, dalam hal ini tikus disuntikkan suspense karagenan secara subplantar. Obat uji diberikan secara oral. Volume udem kaki diukur dengan alat pletismometer. Aktivitas inflamasi obat uji ditunjukkan oleh kemampuan obat uji mengurangi udem yang diinduksi pada telapak kaki hewan uji.

b. Induksi Histamin

Metode yang digunakan hampir sama dengan metode induksi karagenan, hanya saja penginduksi yang digunakan adalah larutan histamin 1%.

c. Induksi Asam Asetat

Metode ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas inhibisi obat terhadap peningkatan permeabilitas vascular yang diinduksi oleh asam asetat secara intraperitoneal. Sejumlah pewarna (*Evan's Blue* 10%) disuntikkan secara intravena. Aktivitas inhibisi obat uji terhadap peningkatan permeabilitas vascular ditunjukkan oleh kemampuan obat uji dalam mengurangi konsentrasi pewarna yang menempel dalam ruang abdomen yang disuntikkan sesaat setelah induksi asam asetat.

d. Induksi Xylene Pada Udem Daun Telinga

Hewan uji diinduksi xylene dengan mikropipet pada kedua permukaan daun telinga kanannya. Telinga kiri digunakan sebagai kontrol. Terdapat dua parameter yang diukur dalam metode ini, yaitu ketebalan dan bobot dari daun telinga mencit. Ketebalan daun telinga mencit yang telah diinduksi diukur dengan menggunakan jangka sorong digital, lalu dibandingkan dengan telinga kiri. Jika menggunakan parameter bobot daun telinga, maka daun telinga mencit dipotong dan ditimbang. Kemudian beratnya dibandingkan dengan berat telinga kiri.

e. Induksi Asam Arakhidonat Pada Udem Daun Telinga

Metode yang digunakan hampir sama dengan metode induksi xylene, hanya saja penginduksi yang digunakan adalah asam arakhidonat yang diberikan secara topikal pada kedua permukaan daun telinga kanan hewan uji.

2.6.2 Model Inflamasi Kronik

Model ini didesain untuk menemukan obat-obat yang dapat memodulasi proses penyakit dan termasuk didalamnya *sponge* dan *pellets implants* serta *granuloma pouches* yang terdeposit dalam jaringan granulasi. Selain itu, *adjuvant induced arthritis* juga termasuk dalam model inflamasi kronik (Singh dkk., 2008).

2.7 Hewan Percobaan

Pola inflamasi untuk hewan percobaan ada dua jenis, yaitu inflamasi akut dan inflamasi kronik. Inflamasi akut dianggap sebagai respon pendek pada efek inflamasi yang diikuti dengan penyembuhan. Hal ini yang membuat inflamasi akut dapat

diidentifikasi secara fisik pada eritema (kemerahan) dan edema (pembengkakan pada jaringan). Inflamasi kronik merupakan inflamasi yang kuat dimana dapat merusak jaringan (Patel *et al.*, 2008).

Pengujian antiinflamasi menggunakan hewan coba dapat dengan menginduksi kaki hewan coba menggunakan karagenan, dapat pula menggunakan TPA (*tetradecanoylphorbol-13acetate*) yang diinduksi pada telinga tikus sebagai model penyebab inflamasi akut. Kedua bahan tersebut merupakan penyebab iritasi yang mengeluarkan histamin, bradikinin, dan juga sintesis protagladin.

Pada pengujian inflamasi kronik digunakan *cotton pellet* dan *glass rod* yang diinduksi *granuloma* dapat diaplikasikan (Zakaria *et al.*, 2011). Bentuk pada *granuloma* dikarenakan perkembangan pada sel inflamasi seperti makrofag dan neutrofil yang digagalkan untuk membuat fase pemecahan. Pada pengujian inflamasi kronik dapat juga menggunakan rancangan TPA yang diinduksikan pada telinga tikus sampai 10 hari. Untuk mengetahui tingkatan inflamasi yang terjadi dan efek antiinflamasi dapat diukur dengan ketebalan, volume atau berat dari edema yang terbentuk.

2.8 Sitokin

Sitokin adalah protein yang disekresikan oleh sel-sel *innate* dan *adaptive immunity* yang memediasi banyak fungsi dari sel-sel ini. Sitokin diproduksi sebagai respon adanya mikroba dan antigen-antigen lain, dan sitokin yang berbeda menstimulasi respon sel yang berbeda dalam imunitas dan inflamasi (Abbas dkk., 2005). Sitokin tersebut mempengaruhi peradangan dan imunitas melalui pengaturan pertumbuhan, mobilitas dan diferensiasi leukosit dan sel-sel jenis lain. Sitokin dapat bersifat autokrin atau berefek pada sel yang menghasilkannya, maupun dapat bersifat parakrin atau bekerja pada sel yang berdekatan. Sitokin bekerja dengan cara berikatan dengan reseptor spesifik pada membran sel, memulai kaskade yang menyebabkan induksi, dan peningkatan atau penghambatan berbagai respon imun (Baratawidjaja, 2004).

Sitokin hampir tidak pernah diproduksi atau bekerja sendirian, tetapi selalu dalam suatu jaringan kerja yang kompleks. Yang termasuk dalam sitokin adalah berbagai interleukin (IL-1, IL-2, dan seterusnya), interferon (IFN α , β , dan γ), faktor

nekrosis tumor (*Tumor Necrosis Factor*, TNF), faktor perangsang koloni (*Colony Stimulating Factor*, CSF), faktor pertumbuhan (*growth factor*), dan khemokin (sitokin khemotaktik), dll. Berbagai macam interaksi antar sitokin, adalah (Baratawidjaja, 2004):

1. Sinergistik atau antagonistik, beberapa sitokin bekerja secara sinergistik atau secara antagonistik terhadap suatu aktivitas tertentu
2. Induksi atau inhibisi, beberapa sitokin dapat menginduksi atau menghambat produksi sitokin yang lain, dalam suatu bentuk sinergi atau antagonism berurutan (efek kaskade)
3. Regulasi ekspresi reseptor, beberapa sitokin meregulasi ekspresi reseptornya sendiri maupun reseptor sitokin yang lain.

Sitokin adalah suatu glikoprotein yang berasal dari sel T helper, sel natural killer (NK) dan makrofag, yang berperan penting pada respon tubuh melawan infeksi. Pada keadaan normal sitokin pasti terdapat di dalam tubuh walaupun dalam jumlah sedikit sebagai sistem kekebalan tubuh. Sel T helper terdiri dari dua subset, masing-masing menghasilkan sitokin yang mengatur perbedaan fungsi imun efektor dan bereaksi satu sama lain. Sel T helper tipe 1 (Th-1) menghasilkan IFN- γ (Interferon gamma), IL-2 (Interleukin-2), dan TNF- α (*Tumor Necrosis Factor* alpha). Sitokin ini mengaktifkan makrofag, untuk membentuk sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1 dan IL-6, dan menginduksi mekanisme imun efektor sitotoksik dari makrofag. Sebaliknya, sel T helper tipe 2 (Th-2) menghasilkan IL-4, IL-5, IL-10, dan IL-13, sitokin ini menginduksi pembentukan antibodi tetapi juga menghambat fungsi makrofag sehingga disebut sitokin antiinflamasi (Plebanski *et al.*, 2002).

2.9 Makrofag (CD68)

Mekanisme pertahanan *host* terdiri dari imunitas alami dan imunitas adaptif. Imunitas alami merupakan pertahanan yang paling pertama. Komponen imunitas alami atau *innate immunity* terdiri dari barrier epitel, fagosit sel NK, sistem komplemen, dll. Selain imunitas alami, juga terdapat sistem imunitas adaptif. Sistem

imunitas adaptif ini terdapat dua tipe, yaitu *cell mediated immunity* dan *humoral mediated immunity* (Abbas dkk., 2005).

Sistem imunitas alami yang berperan melawan mikroba yang masuk menembus epitel ialah sistem fagosit. Sistem fagosit yang bersirkulasi dalam darah terdapat dua tipe, yaitu neutrofil dan monosit. Kedua sel tersebut bekerja pada tempat yang terinfeksi, dimana mereka mengenal dan mencerna mikroba (Abbas dkk., 2005). Tipe sel kedua dalam sistem fagosit ialah sel monosit. Sel tersebut berjumlah 500-1000 per mm³ darah, lebih sedikit dibandingkan jumlah sel neutrofil. Sel monosit mencerna mikroba dalam darah dan jaringan. Tidak seperti neutrofil, monosit dapat masuk ke dalam jaringan ekstrasvaskuler dan bertahan disana dalam waktu yang relatif lebih lama. Sel monosit akan berdiferensiasi menjadi sel makrofag di dalam jaringan. Sel monosit darah dan sel makrofag ialah dua sel yang sejenis, dimana kedua sel tersebut dinamakan sistem fagosit mononuklear (Abbas dkk., 2005).

Makrofag merupakan sel fagosit mononuklear yang utama di jaringan dalam proses fagositosis terhadap mikroorganisme dan kompleks molekul asing lainnya. Makrofag diproduksi di sumsum tulang belakang dari sel induk *myeloid* yang mengalami proliferasi dan dilepaskan ke dalam darah sesudah atau satu periode melalui fase monoblas-fase promonosit-fase monosit. Monosit yang telah meninggalkan sirkulasi darah akan mengalami perubahan-perubahan untuk kemudian menetap di jaringan sebagai makrofag (Baratawidjaja, 2004).

Makrofag dalam darah dapat diaktivasi oleh berbagai macam stimulan atau aktivator, termasuk mikroba dan produknya, kompleks antigen antibodi, inflamasi, limfosit T tersensitasi, sitokin dan trauma. Selain itu makrofag diaktifkan oleh berbagai rangsangan, dapat menangkap, memakan dan mencerna antigen eksogen, seluruh mikroorganisme, partikel tidak larut dan bahan endogen seperti sel pejamu yang cedera atau mati. Makrofag yang teraktivasi mempunyai jumlah lisosom yang meningkat dan menghasilkan serta melepaskan IL-1, yang mempunyai aktivitas luas dalam inflamasi. IL-1 berperan dalam terjadinya edema, dan aktivasi limfoid menyebabkan pelepasan sitokin lainnya (Baratawidjaja, 2004).

CD68 adalah glikoprotein intraseluler 110kD terutama dilaporkan terkait dengan butiran sitoplasma pada tingkat terendah membran makrofag. Pada studi imunohistokimia, antigen CD68 merupakan marker yang paling sering digunakan

untuk identifikasi makrofag (*monocyte, histiocyte, giant cell, Kupffer cell*, dan *osteoclast*). Namun, CD68 juga ditemukan dalam monosit, neutrofil, basofil, dan limfosit besar. Fungsi molekul CD68 tidak tertentu, tetapi CD68 adalah komponen utama protein membran lisosom dan dapat melindungi membran dari serangan hidrolisis asam. Ekspresi protein CD68 telah dibuktikan pada sel T dan sel NK distimulasi, serta jaringan non-haematopoietic seperti hati dan tubulus ginjal (Baratawidjaja, 2004).

2.10 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)

Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) merupakan salah satu sitokin yang terlibat dalam inflamasi sistemik. *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) merupakan sitokin yang bersifat sebagai pirogen, pada kadar rendah dapat menghambat pertumbuhan stadium darah parasit dengan mengaktifkan sistem imun seluler, juga dapat membunuh parasit secara langsung namun aktivitasnya hanya lemah. Adanya peran ganda dari sitokin terutama TNF- α yaitu pada kadar yang tepat akan memberikan perlindungan dan penyembuhan, sedang pada kadar berlebihan yang mungkin merupakan tanggapan terhadap hiperparasitemia dan pertumbuhan parasit yang berlebihan akan menyebabkan kerusakan jaringan yang sangat berat dan fatal (Nugroho dkk., 2000). TNF- α memiliki peran utama dalam pengaturan sel imun. TNF- α menyebabkan apoptosis, proliferasi sel, diferensiasi, inflamasi, tumorigenesis dan replikasi virus. Selain itu, TNF- α juga merupakan sitokin imunomodulator kuat yang diproduksi oleh makrofag dan sebagian oleh sel T yang aktif dan memiliki fungsi penting dalam perkembangan otak.

Sitokin adalah suatu glikoprotein yang berasal dari sel T helper, sel *natural killer* (NK) dan makrofag, yang berperan penting pada respon tubuh melawan infeksi. Pada keadaan normal sitokin pasti terdapat di dalam tubuh walaupun dalam jumlah sedikit sebagai sistem kekebalan tubuh. Sel T helper terdiri dari dua subset, masing-masing menghasilkan sitokin yang mengatur perbedaan fungsi imun efektor dan bereaksi satu sama lain. Sel T helper tipe 1 (Th-1) menghasilkan IFN- γ (interferon gamma), IL-2 (interleukin-2) dan TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alpha*). Sitokin ini mengaktifkan makrofag, untuk membentuk sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1 dan IL-6, dan menginduksi mekanisme imun efektor sitotoksik dari

makrofag. Sebaliknya, sel T helper tipe 2 (Th-2) menghasilkan IL-4, IL-5, IL-10, dan IL-13, sitokin ini menginduksi pembentukan antibodi tetapi juga menghambat fungsi makrofag disebut sitokin antiinflamasi (Plebanski *et al.*, 2002).

Menurut Baratawidjaja (2004), TNF- α merupakan suatu protein yang dihasilkan leukosit untuk merangsang dan mengaktifkan sistem imun terhadap respon inflamasi, dimana dalam keadaan normal patogen pada sistem kekebalan tubuh memicu reaktivitas imun pada imunitas non spesifik maupun spesifik. TNF- α diproduksi oleh berbagai jenis sel termasuk makrofag, sel T, B, NK, astrosit dan kupfer. TNF- α dihasilkan terutama oleh makrofag akibat adanya suatu infeksi. TNF- α yang diproduksi oleh makrofag teraktivasi merupakan sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap mikroba. Semakin banyak makrofag yang terinfeksi maka sitokin TNF- α yang diproduksi lebih banyak, bersamaan dengan itu kadar sitokin antiinflamasi seperti IL-10, masih rendah sehingga tidak dapat menghambat produksi sitokin TNF- α sehingga menimbulkan efek patologik. Beberapa penelitian yang sudah dilakukan menunjukkan bahwa akan terjadi peningkatan terhadap produksi TNF- α pada beberapa penyakit atau stresor.

Efek TNF (*tumor necrosis factor*) pada radang yaitu pada saat ini TNF dianggap sebagai mediator utama dalam radang. Efek biologi TNF- α adalah meningkatkan ekspresi molekul adhesi pada permukaan endotel pembuluh darah yaitu *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), selectin dan integrin ligand, juga pada permukaan leukosit yaitu selectin ligand dan integrin. Ekspresi molekul adhesi tersebut akan menyebabkan peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan migrasi leukosit ke tempat infeksi untuk menyingkirkan mikroba. Selain itu produksi TNF- α dalam jumlah yang besar dapat menghambat kontraktilitas otot jantung, menurunkan tekanan darah (syok), trombosis intravaskular dan ekspresi *tissue factor* (TF) (Abbas dkk., 2005).

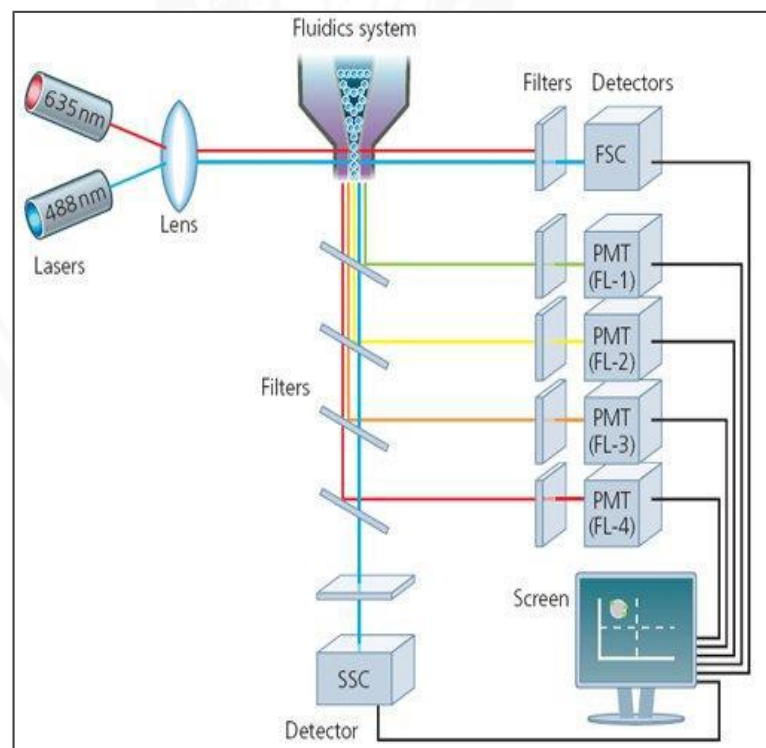
Peningkatan permeabilitas pembuluh darah akan menyebabkan perembesan plasma (*plasma leakage*) dari ruang intravaskular ke ruang interstisial sehingga terjadi peningkatan hematokrit, hipoproteinemia, hiponatremia, hipovolemia (syok), adanya cairan dalam rongga pleura dan peritoneum (Setiati, 2004).

TNF- α dihubungkan dengan beratnya penyakit, bila TNF- α tinggi dapat menyebabkan terjadinya supresi eritropoesis, pengurangan produksi eritropoetin dan meningkatkan eritrofagositosis. Fungsi sitokin TNF- α adalah merangsang ekspresi

molekul adhesi pada endotel pembuluh darah dan leukosit yang akan menyebabkan peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan reaksi inflamasi (Baratawidjaja, 2004).

2.11 Flowcytometry

Flowcytometry merupakan teknologi yang menganalisis berbagai karakteristik sel (fisik dan kimiawi) secara individual dan cepat. Penggunaan *flowcytometry* memungkinkan kita untuk melakukan karakterisasi multiparameter secara kuantitatif pada populasi sel yang heterogen sehingga dapat mengidentifikasi subpopulasi spesifik. Teknologi *flowcytometry* telah menghasilkan informasi diagnostik dan prognostik yang signifikan serta mempunyai pengaruh yang besar terhadap imunologi dan hematologi (Brown dkk., 2000). Prinsip kerja *flowcytometer* dapat dilihat pada **Gambar 2.7**.



Gambar 2.7 Ilustrasi Prinsip Kerja *Flowcytometer* (Rahman, 2014)

Prinsip kerja *flowcytometer* secara umum mempunyai 4 komponen dasar yaitu pertama *fluidic system* untuk membawa suspensi sel tunggal dan tube sampel ke dalam *quartz flow cell* yang berisi *sheath fluid*. Komponen kedua yaitu sumber sinar biasanya laser ion argon dengan energi eksitasi 488 nm. Komponen ketiga adalah filter dan fotodetektor untuk mengumpulkan sinar *scatter* dan sinar emisi dari sel yang terlabel fluorosens serta prosesor untuk mengubah signal menjadi arus listrik analog dan kemudian menjadi signal digital. Komponen keempat adalah *system computer* untuk mengumpulkan, menyimpan, dan menganalisis data (Rahman, 2014).

Di dalam *flowcytometer* suspensi sel dibuat menjadi suatu aliran yang dibentuk dengan *surrounding sheath of isotonic fluid* yang membentuk *laminar flow*, memungkinkan sel melewati *interogation point* satu per satu. Di *interogation point*, suatu sinar monokromatik biasanya dari laser menembus sel yang berlabel fluorokhrom. Sinar emisi kemudian ditangkap optik yang akan meneruskan sinar ke beberapa filter dan cermin dichroic yang mengisolasi band dengan panjang gelombang tertentu. Signal sinar dideteksi menggunakan photomultiplier tubes dan dilakukan digitalisasi untuk analisis komputer.

Aplikasi klinik *flowcytometer* di bidang imunologi paling banyak digunakan adalah untuk menghitung sel T CD4 pada pasien dengan infeksi HIV. Perhitungan limfosit CD4 pada pasien yang mempunyai antibodi HIV positif digunakan untuk memonitor penyakit. Penghitungan CD4 pada pasien HIV lebih spesifik dengan analisis *flowcytometry* dua warna. *Flowcytometry* juga sering digunakan untuk memantau jumlah absolut limfosit T CD3 di darah tepi pasien untuk menyesuaikan dosis terapi obat OKT3. Pada pengukuran kadar sitokin, *flowcytometry* memberikan informasi yang berguna pada proses patologis berbagai penyakit, serta untuk memantau perkembangan penyakit dan atau inflamasi. Sitokin bisa diukur dari serum atau plasma, jaringan, atau sel mononuklear darah tepi (Intansari dkk., 2003). Deteksi sitokin intrasel menggunakan *flowcytometer* dilakukan dengan cara meningkatkan permeabilitas sel dan antibodi monoklonal akan berkaitan dengan protein sitokin intrasel. Metode ini dapat mengidentifikasi sel-sel yang memproduksi

sitokin tertentu. Metode ini juga memungkinkan deteksi fungsional populasi sel T memori yang merespon terhadap antigen soluble pada restimulasi jangka pendek (Intansari dkk., 2003).



III METODOLOGI PENELITIAN

1.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, Laboratorium Nutrisi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Fisiologi Hewan FMIPA Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Agustus 2015 hingga November 2015.

1.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

3.2.1.1 Alat Ekstraksi Daun Sukun

Alat yang digunakan untuk ekstraksi simplisia daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) adalah timbangan analitik merk *OHAUS PIONEER*, *glassware*, *vacuum rotary evaporator* merk IKA HB10D, kain saring halus, dan *ultrasonic extractor*.

3.2.1.2 Alat Analisis Ekstrak Daun Sukun

Alat yang digunakan untuk analisis ekstrak simplisia daun sukun adalah timbangan analitik merk *Denver* M310 USA, tabung reaksi, kertas saring halus dan kasar, pipet ukur ukuran 1 ml, 5 ml, dan 10 ml, vortex IKA Bentul-2, labu ukur 10 ml dan 25 ml, kuvet, spektrofotometer merk Lab Med.Inc, pipa kapiler, dan silika gel G₆₀F₂₅₄.

3.2.1.3 Alat Perawatan Hewan Coba

Alat-alat yang digunakan dalam perawatan hewan coba adalah kandang bak plastik, pembatas besi, tutup kandang dari kawat, piring pakan, tempat minum, pembersih kandang, jarum sonde mencit, dan timbangan mencit.

3.2.1.4 Alat Pengujian Aktivitas Inflamasi

Pengujian ini dilakukan menggunakan metode uji *in vivo* dengan penggunaan alat uji berupa spuit 3 cc, penggaris, spidol, spuit 1 cc, labu ukur 10 ml, gunting bedah, pinset, vacuumtainer EDTA, tabung falcon 15 ml, *microtube*, mikropipet 1 ml dan 0,1 ml, *microtip*, sentrifuge 15 ml C-3 Select, sentrifuge dingin, dan *flowcytometer BD FACS Calibur System*.

3.2.2 Bahan

3.2.2.1 Bahan Ekstraksi Daun Sukun

Bahan yang digunakan untuk ekstraksi adalah tanaman daun sukun dan etanol 70%. Daun sukun merupakan bahan utama pada penelitian ini. Daun sukun yang dipilih untuk penelitian ini adalah daun sukun baik yang muda maupun yang tua, namun lebih diutamakan daun sukun yang tua karena kandungan flavonoidnya lebih besar. Flavonoid yang terkandung pada daun sukun tua, muda, serta tua menguning dan gugur masing-masing adalah 100,68 mg/g, 87,03 mg/g, dan 42,89 mg/g (Shabella, 2012).

3.2.2.2 Bahan Analisis Ekstrak Daun Sukun

Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis ekstrak daun sukun adalah sampel (ekstrak simplisia daun sukun), aquades, etanol 70%, pereaksi Folin Ciocalteu, larutan DPPH, etanol 96%, larutan standard rutin.

3.2.2.3 Bahan Perawatan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit putih (*Mus musculus*) galur Balb-c jantan dengan berat 25-35 gram, usia 2-3 bulan. Mencit cenderung aktif pada malam hari, sedangkan siang hari digunakan untuk istirahat dan tidur sehingga pada siang hari mencit lebih mudah untuk ditangani. Pemilihan jenis jantan didasarkan pada fungsi hormonal yang kurang berperan dalam menimbulkan respon inflamasi adaptif. Bahan-bahan yang dibutuhkan untuk perawatan hewan coba adalah pakan standard rutin, air minum, dan sekam.

3.2.2.4 Bahan Pengujian Aktivitas Anti Inflamasi

repository.ub.ac.id

Bahan yang digunakan untuk pengujian inflamasi adalah karagenan, NaCl 0,9%, aquades, natrium diklofenak, dan air raksa, kloroform, Ficoll (*lymphocyte separating media*), PBS, cytofix, anti *TNF- α* polyclona, formalin 10%.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Penelitian Tahap 1: Ekstraksi Daun Sukun

Metode ekstraksi yang digunakan untuk membuat ekstrak simplisia daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) yaitu metode ultrasonik. Pertama, tanaman daun sukun disortasi lalu diambil bagian daunnya. Setelah itu, daun sukun tersebut dihancurkan lalu ditimbang. Kemudian diekstraksi dengan metode ultrasonik menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:20 (b/v) pada suhu 65°C selama 50 menit. Larutan ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator*. Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemen yang diperoleh (Li *et al.*, 2010).

3.3.2 Penelitian Tahap 2: Pengujian Antiinflamasi Ekstrak Daun Sukun Secara *In Vivo*

Hasil ekstraksi daun sukun dengan perlakuan terbaik selanjutnya akan diuji lebih lanjut dengan metode *in vivo* untuk mengetahui potensinya sebagai agen antiinflamasi. Pada pengujian ini menggunakan Rancangan Tersarang (*Nested Design*) yang disusun dalam 2 faktor, yaitu kelompok perlakuan mencit dengan pemberian dosis dan waktu pengukuran edema. Kelompok mencit berdasarkan dosis yang digunakan dibagi menjadi 6 (P), yaitu:

P1: Kontrol Negatif (Sehat)

P2: Kontrol Positif (Sakit)

P3: Kontrol Positif dengan pemberian natrium diklofenak 0,195 mg/30 g BB

P4: Kelompok uji ekstrak dosis 1 (15 mg/20 g BB)

P5: Kelompok uji ekstrak dosis 2 (30 mg/20 g BB)

P6: Kelompok uji ekstrak dosis 3 (60 mg/20 g BB)

Penelitian pengaruh ekstrak simplisia daun sukun sebagai anti inflamasi pada mencit jantan yang diinduksi karagenan ini dilaksanakan dalam waktu yang cukup singkat yaitu dalam waktu satu hari pengujian. Tahap pertama yang dilakukan adalah mengukur volume awal telapak kaki mencit sebelum diberi perlakuan apapun. Setelah tahap tersebut, baru dilakukan beberapa tahap selanjutnya. Pengujian dilakukan dengan menggunakan hewan coba yaitu

mencit jantan dengan berat badan 25-35 gram. Mencit dibagi menjadi 6 kelompok yaitu 3 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan.

Tiga kelompok kontrol terdiri atas kelompok kontrol negatif (mencit normal tanpa induksi karagenan), kontrol positif (mencit sakit yang dikondisikan mengalami inflamasi dengan diberi perlakuan induksi karagenan 1% sebanyak 0,1 ml pada telapak kaki dan tanpa pemberian obat), dan kontrol obat (mencit sakit yang dikondisikan mengalami inflamasi dengan diberi perlakuan induksi karagenan 1% sebanyak 0,1 ml pada telapak kaki dan diberi perlakuan sonde obat natrium diklofenak 0,13 mg/20 g BB). Sedangkan pada kelompok perlakuan juga dibagi menjadi 3 kelompok yaitu dosis ekstrak simplisia daun sukun sebanyak 15 mg/20 g BB, 30 mg/20 g BB, dan 60 mg/20 g BB. Obat dan ekstrak diberikan pada mencit secara intraperitoneal atau langsung ke dalam rongga perut. Pemberian obat dan ekstrak dilakukan 1 jam sebelum mencit diinduksi karagenan 1% sebanyak 0,1 ml. Hal ini sesuai dengan penelitian dari Apriani (2011) yang menyebutkan bahwa pemberian bahan uji 60 menit sebelum induksi dikarenakan pada waktu tersebut diperoleh persentase penghambatan edema rata-rata yang terbesar.

3.3.3 Penelitian Tahap 3: Pengujian Analisis TNF- α

Setelah pengujian *in vivo* dari 6 perlakuan kelompok, kemudian dilakukan uji TNF- α . Analisis TNF- α dilakukan dengan mengambil darah hewan coba melalui jantung, selanjutnya dilakukan pengujian menggunakan *flowcytometry*. Hasil dari analisis dilihat dengan membandingkan kadar TNF- α pada hewan coba kontrol negatif dalam keadaan sehat dengan 5 perlakuan kelompok uji, semakin mendekati nilai pada kontrol negatif semakin baik.

1.4 Pelaksanaan Penelitian

1.4.1 Pembuatan Ekstrak Daun Sukun (*Artocarpus altilis* (Park.))

Tahapan proses pembuatan ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) adalah sebagai berikut:

- a. Simplisia kering daun sukun dihaluskan dan ditimbang.

- b. Dilakukan proses ekstraksi dengan metode ultrasonik pada suhu 65°C, perbandingan antara simplisia daun sukun dengan etanol 70% 1:20 (b/v) selama 50 menit. Jadi, tiap 1 gram simplisia daun sukun dicampur 20 ml larutan etanol.
- c. Dipisahkan dan disaring cairan ekstrak daun sukun dengan padatannya menggunakan kain saring, padatannya dibuang.
- d. Dilakukan proses evaporasi pada cairan ekstrak hasil ekstraksi dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40°C.
- e. Diperoleh ekstrak pekat daun sukun

1.4.2 Analisis Ekstrak Simplisia Daun Sukun (*Artocarpus altilis* (Park.))

Pada penelitian ini, pengamatan dan analisis dilakukan pada sampel hasil ekstraksi daun sukun. Parameter yang diamati dalam analisis meliputi :

1. Analisis total flavonoid
2. Analisis total fenol
3. Aktivitas antioksidan dan IC₅₀.

1.4.3 Pengujian *In Vivo* Ekstrak Simplisia Daun Sukun sebagai Anti inflamasi

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penurunan aktivitas inflamasi pada mencit jantan. Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa mencit (*Mus musculus*) jantan dengan berat 25-35 gram yang berusia 2-3 bulan sebanyak 24 ekor, dimana terdapat 6 kelompok dan setiap 1 kelompok digunakan 1 ekor mencit cadangan. Penggunaan cadangan pada setiap kelompok mengacu pada *Research Guidiliines For Evaluation the Safety and Efficiency of Herbal Medicines* dari WHO yang mengatakan bahwa setiap kelompok perlakuan hewan coba digunakan 1 ekor cadangan untuk mengantisipasi kekurangan sampel karena hewan coba mengalami kematian.

1.4.3.1 Masa Adaptasi Hewan Coba

Sebelum mencit jantan dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, kandang untuk mencit dibersihkan, peralatan makan dan minum mencit dibersihkan serta dicuci dengan sabun dan kandang diberi sekam. Kemudian 24 ekor mencit dikandangkan secara terpisah antara mencit yang satu dengan yang lain.

Masa adaptasi meliputi proses adaptasi terhadap lingkungan selama 2 minggu sebelum memasuki masa perlakuan. Pemberian makanan dan minuman pada mencit dilakukan secara *ad libitum*. Kemudian dilakukan pengamatan yang rutin terhadap keadaan umum serta berat badan mencit ditimbang setiap hari untuk mengetahui perubahan berat badan.

1.4.3.2 Masa Pengkondisian Radang pada Hewan Coba

Setelah mencit diadaptasikan terhadap lingkungan selama 2 minggu, kemudian mencit dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kontrol positif, kontrol positif dengan pemberian obat natrium diklofenak, kontrol ekstrak dosis 15 mg/20 g BB, kontrol ekstrak dosis 30 mg/20 g BB, dan kontrol dosis 60 mg/20 g BB. Pengkondisian radang dilakukan dengan penginduksian larutan karagenan 1% dengan dosis 0,1 ml pada telapak kaki mencit. Penginduksian dengan karagenan agar menyebabkan edema maksimal. Penelitian dari Hafeez *et al.* (2013) menyebutkan bahwa dengan pemberian karagenan konsentrasi 1% sebanyak 0,1 ml menghasilkan edema terbesar pada telapak kaki mencit.

1.4.3.3 Pengujian Anti Inflamasi pada Hewan Coba

Prosedur pengujian anti inflamasi pada hewan coba dilakukan dengan metode perubahan volume air raksa, yaitu sebagai berikut (Rustam *et al.*, 2007):

- a. Mencit dipuaskan ± 18 jam sebelum pengujian, air minum tetap diberikan.
- b. Mencit ditimbang dan dikelompokkan secara acak, ada 6 perlakuan mencit dengan jumlah mencit masing-masing kelompok adalah 4 ekor.
- c. Kaki kiri belakang mencit yang akan diinduksi diberi tanda pada mata kaki, kemudian diukur terlebih dahulu dengan cara memasukkan telapak kaki mencit ke dalam raksa hingga tanda batas.
- d. Setiap mencit diberikan bahan uji secara oral sesuai dengan kelompoknya.
- e. Satu jam kemudian, telapak kaki kiri belakang setiap mencit pada masing-masing kelompok disuntik dengan 0,1 ml karagenan 1% secara subplantar.
- f. Volume telapak kaki mencit diukur secara manual pada jam ke-1, 2, 3, 4, dan 5 setelah diinduksi karagenan, dengan cara memasukkan telapak kaki mencit dalam spuit hingga tanda batas sehingga terlihat kenaikan air raksa di dalam spuit tersebut.

g. Semua data yang diperoleh dianalisis secara statistik terhadap volume telapak kaki mencit dan dihitung persentase penghambatan edema.

Aktivitas antiinflamasi diukur dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Rustam *et al*, 2007):

$$\% Edema = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

Keterangan:

V_t : Volume edema pada waktu t

V_0 : Volume kaki mencit sebelum diinduksi karagenan

$$\% \text{ Inhibisi Edema} = \frac{\% Edema \text{ kontrol} - \% Edema \text{ uji}}{\% Edema \text{ kontrol}}$$

Nilai dari persentase inhibisi edema menunjukkan kemampuan antiinflamasi ekstrak simplisia daun sukun.

1.4.3.4 Pengukuran Kadar CD68 dan TNF- α Metode *Flowcytometry*

Darah diambil dari jantung mencit, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang mengandung EDTA dan diguling-gulingkan atau dikocok perlahan agar darah mengenai EDTA yang ada di dinding tabung. Selanjutnya darah dimasukkan ke dalam falcon 15 ml yang telah diisi Ficoll (*Lymphocyte separate media*) dengan perbandingan 1:1. Disentrifugasi suhu ruang 20°C, 1500 rpm selama 30 menit. Diambil *buffycoat* atau sel darah putih yang telah terpisah (lapisan tengah). Ditampung dalam falcon 15 ml yang telah diisi larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Kemudian disentrifugasi suhu dingin dan dibuang filtratnya. Pelet yang diperoleh ditambahkan antibodi anti CD68 yang sudah diencerkan dengan PBS (1:50) sebanyak 50 μ L. Diinkubasi dalam keadaan gelap dan suhu dingin 4°C selama 20 menit. Ditambah 100 μ L *buffercytofix*. Diinkubasi dalam keadaan gelap dan suhu dingin 4°C selama 20 menit, lalu ditambah 500 μ L WPS. Setelah itu dilakukan lagi sentrifugasi suhu dingin dan dibuang filtratnya. Pelet yang diperoleh ditambahkan anti TNF- α yang sudah diencerkan dengan PBS (1:50) sebanyak 50 μ L. Lalu diinkubasi dalam keadaan gelap dan suhu dingin 4°C

selama 20 menit. Ditambah PBS 300 μ L. Diambil larutan 300 μ L dan dibaca pada *flowcytometer*.

1.4.4 Populasi dan Sampel Hewan Coba

Penentuan jumlah ulangan mengikuti rumus penentuan replikasi yang dilakukan oleh Daniel (2005) yaitu dihitung berdasarkan rumus :

$$n = \frac{Z^2 \cdot \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan :

n : jumlah sampel

σ : standart deviasi sampel

d : kesalahan yang masih dapat ditoleransi, diasumsikan $d = \sigma$

Z : konstanta pada tingkat kesalahan tertentu, jika $\alpha = 0,05$ maka $Z = 1,96$

Perhitungan

$$n = \frac{Z^2 \cdot \sigma^2}{d^2} \text{ dengan diasumsikan } d = \sigma, \text{ maka } n = Z^2$$

$$\begin{aligned} &= (1,96)^2 \\ &= 3,84 \\ &= 4 \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan diatas dapat diasumsikan bahwa penggunaan hewan coba minimal 4 ekor untuk setiap perlakuan, sehingga untuk 6 kelompok perlakuan dibutuhkan minimal 24 ekor mencit. Penelitian ini menggunakan mencit (*Mus musculus*) galur Balb-c jantan dengan berat 25-35 gram yang berusia 2-3 bulan.

1.4.5 Penentuan Besar Dosis Perlakuan

Perhitungan pemberian dosis dilakukan mengacu pada penelitian mengenai obat tradisional sebagai anti inflamasi yang telah diteliti Andriani (2013) menggunakan rebusan daun sukun dengan dosis 100 mg/ Kg BB, 200 mg/ Kg BB, dan 400 mg/ Kg BB. Hasilnya daun sukun pada dosis 400 mg/ Kg BB terbukti mampu meningkatkan aktivitas anti inflamasi pada

tikus dengan durasi 0,5 jam sampai 4 jam, dan bereaksi sebagai antagonis PGE-2 dan bradikinin pada trakea. Pada dosis 400 mg/ Kg BB terjadi penghambatan radang signifikan ($p < 0,05$) dari 60 menit sampai 4 jam.

Pemberian perlakuan ekstrak simplisia daun sukun dibagi menjadi 3 dosis. Besarnya dosis yang akan diberikan pada hewan coba, dilakukan analogi atau konversi dosis dengan dosis terhadap tikus. Menurut Kusumawati (2004), dosis untuk mencit adalah 0,14 kali dosis tikus.

1. Dosis aman pemberian natrium diklofenak untuk hewan coba (mencit) adalah 0,195 mg/ 20 g BB
2. Dosis ekstrak simplisia daun sukun untuk hewan coba (mencit) :
 - Dosis 1 = 15 mg/ 20 g BB mencit
 - Dosis 2 = 30 mg/ 20 g BB mencit
 - Dosis 3 = 60 mg/ 20 g BB mencit

Jadi, dosis ekstrak simplisia daun sukun yang digunakan pada penelitian ini adalah 15 mg/ 20 g BB, 30 mg/ 20 g BB, dan 60 mg/ 20 g BB. Dosis perlakuan akan diberikan dengan cara sonde pada setiap mencit dengan perhitungan berdasarkan berat badan mencit dengan rumus:

$$\text{Kadar pemberian: } \frac{\text{Berat badan mencit (gr)}}{20} \times \text{dosis}$$

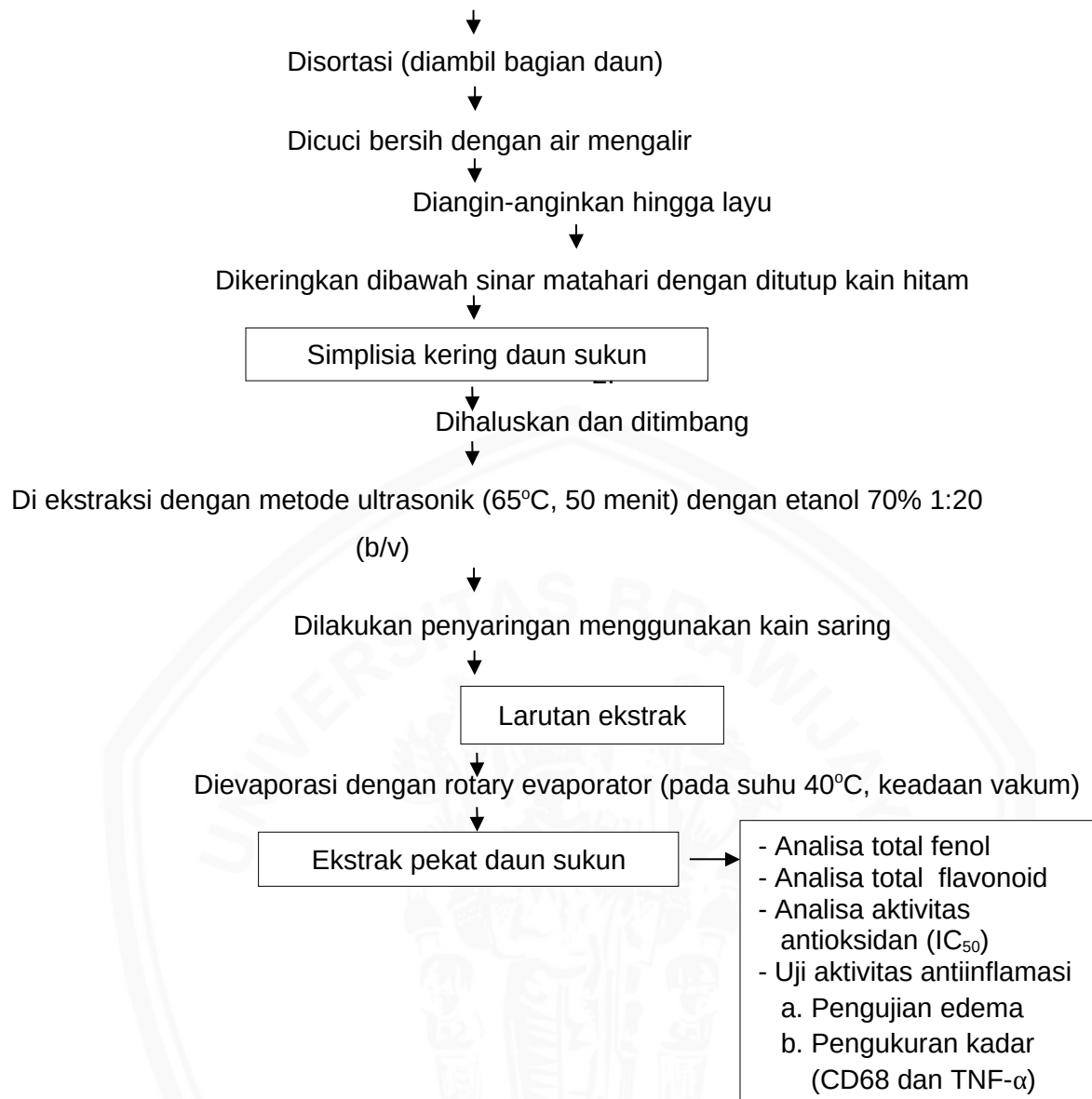
1.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengukuran volume edema dianalisa menggunakan analisis ragam ANOVA (*Analysis of Variance*) *two factor-with replication* untuk pengujian edema dan ANOVA *single factor* untuk pengujian CD68 dan TNF- α , hal ini untuk mengetahui data yang diperoleh apakah menunjukkan adanya perbedaan pada setiap perlakuan yang diberikan pada sampel. Jika hasil uji menunjukkan adanya perbedaan, maka akan diuji lanjut menggunakan uji lanjut BNT dengan menggunakan tingkat kepercayaan 95%.

1.6 Diagram Alir Penelitian

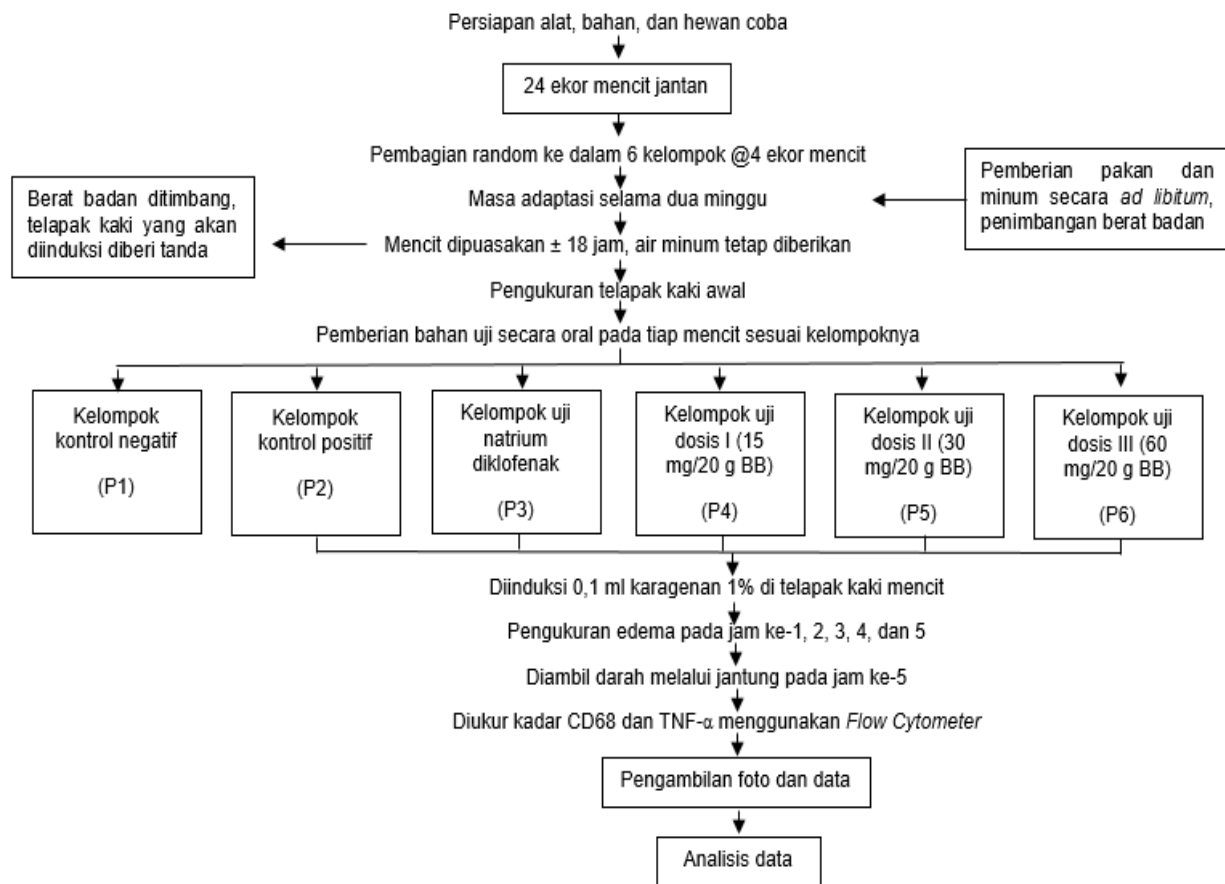
1.6.1 Tahap Pembuatan Ekstrak Simplisia Daun Sukun

Tanaman daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.))



Gambar 3.1 Pembuatan Ekstrak Daun Sukun (modifikasi Dai *et al.*, 2005)

3.6.2 Pengujian Aktivitas Antiinflamasi



Gambar 3.2 Pengujian Efek Anti Inflamasi Pada Hewan Coba (Rustam *et al.*, 2007)

IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi Daun Sukun (*Artocarpus altilis* (Park.))

Pada penelitian ini digunakan tanaman sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)). Tanaman ini diperoleh dari toko Herbaltama Persada, Yogyakarta dalam bentuk simplisia kering. Sedangkan dalam bentuk segar, daun sukun diperoleh dari Toko Istana Alam, Lasem, Jawa Tengah. Pada penelitian ini, tanaman sukun yang digunakan hanya bagian daunnya saja yang telah dikeringkan. Sebelum digunakan, daun sukun disortasi, kemudian dihaluskan dengan blender kering, lalu diekstraksi.

4.2 Analisis Senyawa Bioaktif dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Simplisia Daun Sukun

Analisis senyawa bioaktif dan aktivitas antioksidan merupakan tahap awal yang dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia suatu bahan. Oleh karena itu dilakukan analisis pada bahan penelitian yang meliputi bahan baku basah atau tanaman segar daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)), simplisia daun sukun dan ekstrak simplisia daun sukun. Berikut adalah hasil pengujian senyawa flavonoid, fenol dan aktivitas antioksidan pada tanaman segar daun sukun, simplisia daun sukun, dan ekstrak daun sukun yang dapat dilihat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Hasil Analisis Total Flavonoid, Total Fenol, dan Aktivitas Antioksidan Bahan Baku, Simplisia dan Ekstrak Daun Sukun

Sampel	Total Flavonoid (mg/g)	Total Fenol (mg GAE/g)	Aktivitas Antioksidan (%)	IC ₅₀ (ppm)
Bahan baku segar				
daun sukun	0,91±0,05	2,55±0,02	41,53±4,36	203,47±6,02
Simplisia daun				
sukun	5,87±0,92	10,22±0,10	54,79±4,89	109,25±2,2

Ekstrak daun				
sukun	43,16±2,72	53,41±2,42	70,18±1,44	76,21±0,04

4.2.1 Total Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Senyawa flavonoid yang terdapat di dalam bahan pangan diantaranya adalah kuersetin, kaempferol, luteolin, myricetin, dan katekin. Flavonoid yang paling mudah ditemukan dan umumnya merupakan komponen terbanyak dalam tanaman adalah kuersetin yang termasuk dalam kelas flavonol. Senyawa kuersetin adalah senyawa yang paling aktif dibandingkan senyawa lain dari golongan flavonol (Ross dkk., 2002).

Penentuan total flavonoid pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan total senyawa flavonoid yang terdapat dalam bahan uji. Konsentrasi larutan standar flavonoid kuersetin yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0, 20, 40, 80, 120, 160, dan 200 ppm (*part per million*). Masing-masing dibuat dalam pelarut etanol 70% dari larutan standar induk 1000 ppm atau setara dengan 1 mg/ml. Konsentrasi 0 ppm adalah konsentrasi blanko berupa etanol murni.

Berdasarkan hasil penentuan absorbansi larutan standar tersebut dapat digambarkan kurva kalibrasi larutan standar berupa grafik kurva konsentrasi (x) versus absorbansi (y) yang dapat ditunjukkan pada **Lampiran 5**. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar diperoleh hubungan yang linear antara absorbansi dengan konsentrasi yaitu $y = 0,0007x + 0,0158$ dengan linearitas sebesar 0,9945. Besarnya linearitas ini mendekati nilai satu sehingga dapat dikatakan bahwa absorbansi merupakan fungsi yang besarnya berbanding lurus dengan konsentrasi.

Persamaan pada kurva kalibrasi standar senyawa flavonoid pada penelitian ini menggunakan standar kuersetin. Persamaan kurva kalibrasi standar kuersetin digunakan sebagai pembanding dalam analisis kuantitatif pada pengukuran kandungan senyawa flavonoid kuersetin pada bahan baku, simplisia, dan ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)).

Berdasarkan data pada **Tabel 4.1**, hasil analisis total flavonoid dengan menggunakan spektrofotometer menunjukkan bahwa kandungan senyawa flavonoid rata-rata pada bahan baku (tanaman segar daun sukun) sebesar

0,91±0,05 mg/g, pada simplisia daun sukun adalah 5,87±0,92 mg/g, dan pada ekstrak daun sukun sebesar 43,16±2,72 mg/g. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa dalam satu gram tanaman segar daun sukun mengandung 0,91 mg senyawa flavonoid, sedangkan pada simplisia daun sukun mengandung 5,87 mg senyawa flavonoid, dan pada ekstrak daun sukun mengandung 43,16 mg senyawa flavonoid.

Data pada **Tabel 4.1** tersebut menunjukkan adanya perbedaan hasil kandungan senyawa flavonoid pada tanaman segar daun sukun, simplisia daun sukun, dan ekstrak daun sukun. Kadar flavonoid paling besar didapatkan pada ekstrak daun sukun, yaitu sebesar 43,16 mg/g ekstrak. Hal ini dikarenakan proses ekstraksi merupakan suatu proses penyarian atau penarikan zat-zat aktif dari bahan alam. Sehingga senyawa flavonoid dan zat aktif lainnya akan keluar dari dalam sel bersama dengan pelarut tertentu yang digunakan dalam proses ekstraksi tersebut. Selain itu, kadar air yang ada di dalam bahan juga mempengaruhi banyaknya komponen senyawa yang akan terekstrak melalui pelarut. Menurut Winarno (2004), air berfungsi sebagai bahan yang dapat mendispersikan senyawa yang ada dalam bahan.

Berdasarkan **Tabel 4.1**, menunjukkan bahwa pada setiap sampel diperoleh adanya perbedaan hasil kandungan senyawa flavonoid. Dari data tersebut, kemudian dilakukan uji statistik ANOVA dan diperoleh hasil berbeda nyata dengan nilai $P < 0,05$ seperti yang ditunjukkan pada **Lampiran 5**, sehingga dilakukan uji lanjut BNT dengan selang kepercayaan 95%. Berikut adalah data hasil uji lanjut BNT yang dapat dilihat pada **Tabel 4.2**.

Tabel 4.2 Uji Lanjut BNT Total Flavonoid Bahan Baku, Simplisia, dan Ekstrak Daun Sukun

Sampel	Rata-Rata Total Flavonoid (mg/g)	
Bahan baku segar daun sukun	0,91±0,05	a
Simplisia daun sukun	5,87±0,92	a
Ekstrak daun sukun	43,16±2,72	b

Keterangan : *Data merupakan rerata dari 3 kali ulangan

Dari hasil uji BNT di atas, notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata. Pada sampel bahan baku segar dan simplisia daun sukun menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata, sedangkan pada ekstrak daun sukun menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dengan bahan baku segar maupun simplisia daun sukun. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun sukun merupakan perlakuan yang paling baik (berbeda) atau yang paling mampu memberikan rata-rata flavonoid tertinggi.

Senyawa flavonoid terdistribusi secara luas pada tanaman, memiliki berbagai fungsi dan kontribusi yang penting dalam kesehatan manusia, seperti sebagai antioksidan, anti peradangan, anti alergi, dan mampu menghambat oksidasi dari LDL. Efek yang paling penting dari flavonoid adalah kemampuannya menangkap radikal bebas. Keberadaan flavonoid akan menstabilkan *reactive oxygen species* (ROS) dengan cara berikatan dengan senyawa reaktif. Hal ini dikarenakan reaktivitas yang tinggi dari komponen hidroksil pada flavonoid dapat menyebabkan radikal bebas menjadi inaktif (Njiveldt *et al.*, 2001).

4.2.2 Total Fenol

Penentuan total fenol pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa fenolik yang terdapat dalam bahan uji. Pengukuran total fenol yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan metode yang mereaksikan ekstrak bahan dengan senyawa Folin Ciocalteu. Prinsip dari metode Folin Ciocalteu adalah terbentuknya senyawa kompleks berwarna biru yang dapat diukur pada panjang gelombang 765 nm. Selama reaksi berlangsung, gugus hidroksil pada senyawa fenolik bereaksi dengan pereaksi Folin Ciocalteu membentuk kompleks molibdeum-tungsten berwarna biru dengan struktur yang belum diketahui dan dapat dideteksi dengan spektrofotometer (Apsari, 2011).

Pengukuran total fenol dilakukan dengan membandingkan fenol yang ada dalam bahan dengan kurva standar fenol yang dibuat dari asam galat. Konsentrasi asam galat yang digunakan adalah 0, 25, 50, 75, 100, dan 125 ppm. Berikut adalah kurva standar asam galat berupa grafik kurva konsentrasi (x) versus absorbansi (y) yang dapat ditunjukkan pada **Lampiran 6**. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar asam galat diperoleh hubungan yang linear antara absorbansi dengan

konsentrasi yaitu $y=0,0061x + 0,0501$ dengan linearitas sebesar 0,9964. Besarnya linearitas tersebut mendekati nilai satu sehingga dapat dikatakan bahwa absorbansi merupakan fungsi yang besarnya berbanding lurus dengan konsentrasi.

Berdasarkan data pada **Tabel 4.1**, menunjukkan total fenol dari bahan baku (tanaman segar daun sukun) sebesar $2,55 \pm 0,02$ mg/g, sedangkan pada simplisia daun sukun adalah $10,22 \pm 0,10$ mg/g, dan pada ekstrak daun sukun sebesar $53,41 \pm 2,42$ mg/g. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa dalam satu gram tanaman segar daun sukun mengandung 2,55 mg senyawa fenol, sedangkan pada simplisia daun sukun mengandung 10,22 mg senyawa fenol, dan pada ekstrak daun sukun mengandung 53,41 mg senyawa fenol.

Pada **Tabel 4.1** tersebut menunjukkan adanya perbedaan hasil kandungan senyawa fenol pada tanaman segar daun sukun, simplisia daun sukun, dan ekstrak daun sukun. Kadar fenol paling besar didapatkan pada ekstrak daun sukun, yaitu sebesar 53,41 mg/g ekstrak. Selain itu, dapat dilihat bahwa terjadi peningkatan total fenol dari bahan baku segar daun sukun ($2,55 \pm 0,02$ mg/g) dan simplisia daun sukun ($10,22 \pm 0,10$ mg/g) hingga menjadi ekstrak daun sukun ($53,41 \pm 2,42$ mg/g). Peningkatan total fenol dari tanaman segar daun sukun hingga menjadi ekstrak daun sukun disebabkan terekstraknya senyawa bioaktif dari simplisia selama proses ekstraksi.

Berdasarkan **Tabel 4.1**, menunjukkan bahwa pada setiap sampel diperoleh adanya perbedaan hasil kandungan senyawa fenol. Dari data tersebut, kemudian dilakukan uji statistik ANOVA dan diperoleh hasil berbeda nyata dengan nilai $P < 0,05$ seperti yang ditunjukkan pada **Lampiran 6**, sehingga dilakukan uji lanjut BNT dengan selang kepercayaan 95%. Berikut adalah data hasil uji lanjut BNT yang dapat dilihat pada **Tabel 4.3**.

Tabel 4.3 Uji Lanjut BNT Total Fenol Bahan Baku, Simplisia, dan Ekstrak Daun Sukun

Sampel	Rata-Rata Total Fenol (mg/g)	
Bahan baku segar daun sukun	$2,55 \pm 0,02$	a
Simplisia daun sukun	$10,22 \pm 0,10$	b
Ekstrak daun sukun	$53,41 \pm 2,42$	c

Keterangan : *Data merupakan rerata dari 3 kali ulangan

Berdasarkan hasil uji BNT di atas, notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata. Hal ini menunjukkan bahwa dari ketiga sampel, baik bahan baku segar, simplisia, dan ekstrak daun sukun masing-masing memberikan pengaruh yang nyata. Sehingga perlakuan yang paling baik (berbeda) atau yang paling mampu memberikan rata-rata fenol tertinggi adalah ekstrak daun sukun. Meot-Duros dkk. (2009) menjelaskan bahwa senyawa fenol merupakan senyawa yang cenderung mudah larut dalam air karena merupakan senyawa yang bersifat polar sehingga senyawa fenol sedikit larut pada pelarut etanol yang bersifat semi polar.

4.2.3 Aktivitas Antioksidan dan IC_{50}

Hasil analisis persentase aktivitas antioksidan dari tanaman segar daun sukun, simplisia daun sukun, dan ekstrak daun sukun dapat dilihat pada **Tabel 4.1**. Data tersebut menunjukkan persentase aktivitas antioksidan tanaman segar daun sukun sebesar $41,53 \pm 4,36\%$, pada simplisia daun sukun sebesar $54,79 \pm 4,89\%$, dan pada ekstrak daun sukun adalah sebesar $70,18 \pm 1,44\%$. Dilihat dari besarnya persentase aktivitas antioksidan tersebut, dapat diamati bahwa terjadi peningkatan aktivitas antioksidan dari tanaman segar daun sukun dan simplisia daun sukun, hingga menjadi ekstrak daun sukun. Peningkatan aktivitas antioksidan tersebut dapat disebabkan karena terekstraknya senyawa bioaktif dari simplisia daun sukun selama proses ekstraksi. Adanya peningkatan aktivitas antioksidan dari tanaman segar daun sukun menjadi ekstrak daun sukun ini sesuai dengan total flavonoid dan total fenol yang juga meningkat dari bahan baku segar. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan total flavonoid dan total fenol pada ekstrak daun sukun tersebut bersifat sebagai aktivitas antioksidan.

Inhibition concentration (IC_{50}) dapat didefinisikan sebagai konsentrasi larutan sampel yang akan menyebabkan reduksi terhadap radikal bebas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} berarti aktivitas antioksidannya semakin tinggi (Molyneux, 2004). Menurut Jun, dkk. (2006) kategori tingkat kekuatan aktivitas antioksidan IC_{50} yaitu suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan kuat apabila

nilai $IC_{50} < 50$ ppm, antioksidan aktif apabila nilai IC_{50} antara 50-100 ppm, antioksidan sedang apabila nilai IC_{50} antara 101-250 ppm, antioksidan lemah apabila nilai IC_{50} antara 250-500 ppm, dan antioksidan tidak aktif apabila nilai $IC_{50} > 500$ ppm.

Pada **Tabel 4.1** menunjukkan nilai IC_{50} pada tanaman segar daun sukun sebesar $203,47 \pm 6,02$ ppm, simplisia daun sukun sebesar $109,25 \pm 2,2$ ppm, dan ekstrak daun sukun sebesar $76,21 \pm 0,04$ ppm. Dari nilai IC_{50} pada ketiga sampel tersebut menunjukkan ekstrak daun sukun memiliki nilai IC_{50} paling rendah dibandingkan dengan tanaman segar daun sukun dan simplisia daun sukun. Menurut Prakash *et al.* (2001), nilai IC_{50} yang rendah dalam bahan pangan menunjukkan aktivitas antioksidan dari bahan pangan tersebut tinggi. Hal ini yang menunjukkan bahwa nilai persentase inhibisi radang pada kelompok perlakuan ekstrak dosis III lebih besar dibandingkan dengan kelompok perlakuan ekstrak dosis I dan II yang artinya pada perlakuan ekstrak dosis III kemampuannya dalam menghambat edema lebih besar daripada dosis I dan II.

Aktivitas antiinflamasi diperkirakan berkaitan dengan penghambatan pembentukan mediator-mediator inflamasi, baik dari jalur siklooksigenase maupun pembentukan langsung pada fosfolipase A_2 (Singh dkk., 2008). Senyawa yang diketahui berperan dalam menimbulkan efek antiinflamasi dalam ekstrak daun sukun adalah senyawa fenolik seperti flavonoid, saponin, dan alkaloid. Mekanisme antiinflamasi yang dilakukan oleh senyawa flavonoid dapat melalui beberapa jalur, yaitu menghambat aktivitas enzim COX dan/atau lipooksigenase. Penghambatan jalur COX dan lipooksigenase ini secara langsung akan menyebabkan penghambatan biosintesis eicosanoid (prostaglandin) dan leukotriene yang merupakan produk akhir dari jalur COX dan lipooksigenase (Njiveldt *et al.*, 2001).

Lailatul (2015) menyatakan bahwa peningkatan total fenol saat ekstraksi akan seiring dengan peningkatan aktivitas antioksidan. Semakin tinggi komponen fenol yang terkandung dalam bahan pangan akan meningkatkan aktivitas antioksidan dalam bahan pangan tersebut (Arditiana dkk., 2015).

Berdasarkan data diatas diperoleh data aktivitas inhibisi dari ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) yang dinyatakan dalam persentase inhibisi. Persentase inhibisi ini didapatkan dari perbedaan serapan antara absorban reaksi positif (kontrol pelarut) dengan absorban sampel yang diukur dengan

spektrofotometer. Dari data di atas juga dapat terlihat bahwa semakin besar konsentrasi inhibitor (ekstrak daun sukun) yang ditambahkan maka persentase inhibisi juga akan semakin besar.

Berdasarkan **Tabel 4.1**, menunjukkan bahwa pada setiap sampel diperoleh adanya perbedaan hasil persen aktivitas antioksidan. Dari data tersebut, kemudian dilakukan uji statistik ANOVA dan diperoleh hasil berbeda nyata dengan nilai $P < 0,05$ seperti yang ditunjukkan pada **Lampiran 7**, sehingga dilakukan uji lanjut BNT dengan selang kepercayaan 95%. Berikut adalah data hasil uji lanjut BNT yang dapat dilihat pada **Tabel 4.4**.

Tabel 4.4 Uji Lanjut BNT Persentase Aktivitas Antioksidan Bahan Baku, Simplisia, dan Ekstrak Daun Sukun

Sampel	Aktivitas Antioksidan (%)	
Bahan baku segar daun sukun	41,53	a
Simplisia daun sukun	54,79	b
Ekstrak daun sukun	70,18	c

Keterangan : *Data merupakan rerata dari 3 kali ulangan

Dari hasil Uji BNT di atas, notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata. Hal ini menunjukkan bahwa dari ketiga sampel, baik bahan baku segar, simplisia, dan ekstrak daun sukun masing-masing memberikan pengaruh yang nyata. Sehingga perlakuan yang paling baik (berbeda) atau yang paling mampu memberikan persentase aktivitas antioksidan tertinggi adalah ekstrak daun sukun.

4.3 Uji Aktivitas Anti Inflamasi Secara *In vivo*

Pengujian aktivitas antiinflamasi pada penelitian ini dilakukan secara *in vivo* melalui 2 tahap. Tahap pertama yaitu pengujian edema pada hewan coba, yaitu dengan induksi karagenan secara subplantar pada telapak kaki mencit. Kemudian diukur kenaikan edema atau pembengkakan yang terjadi pada telapak kaki mencit

setiap waktunya dengan menggunakan alat sederhana berupa spuit, lalu diukur persen inhibisi radangnya.

Tahap kedua adalah pengukuran makrofag CD68 dan TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-alpha*) dengan menggunakan metode *flowcytometry*. Pengukuran makrofag CD68 dan TNF- α ini menggunakan darah yang diambil dari jantung yang dilakukan di jam ke-5 setelah induksi karagenan.

4.3.1 Pengujian Edema pada Hewan Coba

Inflamasi merupakan suatu respon protektif normal terhadap luka jaringan yang disebabkan oleh trauma fisik, zat kimia yang merusak, atau zat-zat mikrobiologik. Inflamasi juga merupakan usaha tubuh untuk menginaktivasi atau merusak organisme yang menyerang, menghilangkan zat iritan, dan mengatur derajat perbaikan jaringan. Secara umum, daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) dapat digunakan sebagai obat radang, hipertensi, gatal-gatal, sakit gigi, jantung, diabetes, rematik, liver, dan ginjal (Utami, 2013). Adapun kandungan senyawa bioaktif pada daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) yang diduga memiliki efek sebagai antiinflamasi adalah senyawa flavonoid.

Mencit yang mengalami inflamasi ditandai dengan adanya pembengkakan dan warna kemerahan di area yang diinduksi karagenan. Pembengkakan pada telapak kaki mencit merupakan pengkondisian inflamasi jenis osteoarthritis suatu radang yang menyerang persendian. Mencit yang mengalami inflamasi aktivitas fisiknya menurun dikarenakan pembengkakan yang terbentuk sehingga setelah diinduksi karagenan mencit lebih banyak diam dan jika berpindah tempat kaki mencit yang diinduksi karagenan tidak digunakan berjalan. Diagnosa mencit telah mengalami inflamasi sesuai pernyataan Price dkk. (2005) dengan ditunjukkan adanya rubor (kemerahan), tumor (pembengkakan), kalor (panas yang berlebihan pada area pembengkakan), dolor (rasa nyeri pada area pembengkakan), dan *functiolaesa* (gangguan fungsi atau hilangnya fungsi jaringan yang mengalami inflamasi). Kegagalan fungsi jaringan ini karena adanya sirkulasi abnormal akibat penumpukan dan aliran darah yang meningkat karena adanya pelepasan mediator kimia (Price dkk., 2005).

Pada penelitian ini metode pengujian antiinflamasi berdasarkan pada penurunan volume edema kaki mencit yang diinduksi karagenan 1% secara subplantar. Salah satu zat yang dapat digunakan sebagai indikator edema adalah karagenan. Karagenan mampu menimbulkan inflamasi karena karagenan merupakan polisakarida sulfat dengan molekul besar yang dapat menimbulkan jejas jaringan, yang menyebabkan gangguan pada membran sel yang memicu asam arakhidonat mengeluarkan mediator-mediator inflamasi seperti prostaglandin dan leukotrien. Leukotrien dikeluarkan dari jalur lypooxygenase dan prostaglandin dikeluarkan dari jalur cyclooxygenase (COX). Trauma jaringan juga memicu mediator-mediator pro-inflamasi seperti IL-1, TNF- α , dan NO. Mediator-mediator tersebut mampu menyebabkan peningkatan permeabilitas kapiler yang selanjutnya membuat keluarnya cairan pembuluh darah ke jaringan interstitial, dan akhirnya menyebabkan peningkatan cairan ekstrasvaskuler yang disebut dengan edema (Contran dkk., 2007). Karagenan bersifat netral yang hanya menyebabkan edema, tidak menyebabkan nekrosis (kematian jaringan), selain itu karagenan mudah diterima oleh fisiologis tubuh sehingga respon inflamasi cepat terjadi dan pembengkakannya lebih nyata sehingga mudah untuk diamati.

Tahap pertama dalam pengukuran atau pengujian aktivitas antiinflamasi adalah dengan menghitung persentase edema pada telapak kaki mencit yang dikondisikan mengalami inflamasi. Pengukuran penurunan volume edema pada telapak kaki mencit dilakukan dengan menggunakan spuit. Pengukuran persentase edema yang terbentuk diukur setiap jamnya untuk mengetahui pengaruh dan efektivitas ekstrak daun sukun dalam menurunkan edema. Persentase edema diperoleh dari perubahan volume edema yang terbentuk setiap jam. Pengamatan dilakukan sebelum diinduksi karagenan sampai jam ke 5 setelah induksi karagenan. Berikut rerata perubahan persentase edema pada kaki mencit yang dapat dilihat pada **Tabel 4.5**.

Tabel 4.5 Rerata Perubahan Persentase Edema

Jam	Perubahan Persentase Edema (%)*			
	Kontrol Positif	Na Diklofenak	Ekstrak Daun Sukun (mg/ 20 g BB)	
Ke-		0,13 mg/ 20 g	15	30
				60

BB				
			149,81±13,5	
1	174,05±6,25	152,46±9,16	152,08±5,57	8 146,02±10,41
			204,73±14,9	
2	247,92±11,12	213,45±11,84	206,63±18,77	5 200,38±12,14
			218,18±26,5	
3	270,08±16,88	224,43±16,01	224,43±20,53	9 222,35±25,83
			150,38±10,7	
4	257,01±13,85	169,51±5,26	159,28±17,54	2 130,68±12,01
			106,82±11,0	
5	239,39±10,2	113,45±11,84	121,78±5,15	4 71,97±9,87

Keterangan: Nilai diatas menunjukkan nilai rata-rata persentase edema ± standart deviasi;

*Data merupakan rerata dari 4 kali ulangan

Berdasarkan **Tabel 4.5** di atas, dapat dilihat rerata persentase edema pada mencit untuk membuktikan adanya aktivitas inflamasi serta penghambatannya. Pada setiap perlakuan dapat dilihat adanya perbedaan respon yang terjadi dari jam ke-1 hingga jam selanjutnya antara satu perlakuan dengan perlakuan lainnya. Pada kelompok kontrol positif atau kelompok mencit yang dikondisikan mengalami inflamasi namun tidak diberikan perlakuan apapun, dapat dilihat persentase edemanya yang terus mengalami peningkatan dan sedikit menurun pada jam ke-4 dan jam ke-5.

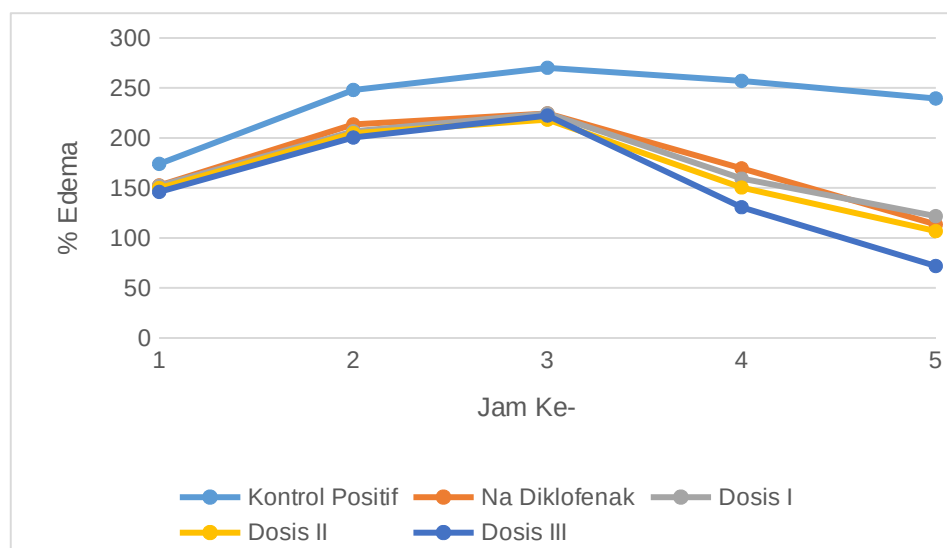
Berdasarkan data pada tabel rerata perubahan persentase edema menunjukkan bahwa pada jam ke-5 setelah induksi karagenan, besarnya edema yang terjadi pada telapak kaki mencit kelompok kontrol obat (natrium diklofenak 0,13 mg/20 g BB), kelompok bahan uji ekstrak daun sukun dosis I (15 mg/20 g BB), dosis II (30 mg/20 g BB), dan dosis III (60 mg/20 g BB) mengalami penurunan yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hal ini terjadi dikarenakan pada kelompok kontrol positif, mencit yang diinduksi karagenan tidak diberi perlakuan apapun sehingga tidak ada rangsangan dari obat atau senyawa kimia yang berfungsi untuk mengurangi edema yang terbentuk, sehingga edema akan terus membesar.

Rerata persentase edema pada kontrol positif terlihat mengalami kenaikan pada jam ke-1 hingga jam ke-3 sebesar 174,05%, 247,92%, 270,08% dan mengalami sedikit penurunan pada jam ke-4 dan jam ke-5 yaitu sebesar 257,01%

dan 239,39%. Sedangkan pada kelompok kontrol obat natrium diklofenak terjadi peningkatan persentase edema mulai jam ke-1 hingga jam ke-3 secara bertahap sebesar 152,46%, 213,45%, 224,43% dan mengalami penurunan pada jam ke-4 dan jam ke-5 secara bertahap sebesar 169,51% dan 113,45%. Persentase edema yang terbentuk pada kelompok kontrol obat lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hal ini disebabkan pada kelompok kontrol obat terdapat rangsangan dari obat natrium diklofenak untuk mengurangi edema yang terjadi.

Pada ekstrak dosis I, persentase edema yang terbentuk di jam ke-1 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol obat natrium diklofenak, yaitu sebesar 152,08%. Lalu persentase edema naik pada jam ke-2 hingga jam ke-3 sebesar 206,63% dan 224,43%, kemudian persentase edema mengalami penurunan secara bertahap pada jam ke-4 dan jam ke-5 yaitu sebesar 159,28% dan 121,78%. Pada mencit dengan perlakuan pemberian ekstrak dosis II, persentase edema pada jam ke-1 memiliki nilai yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, kontrol obat, dan dosis I yaitu sebesar 149,81%, kemudian mengalami kenaikan pada jam ke-2 hingga jam ke-3 sebesar 204,73% dan 218,18%. Lalu pada jam ke-4 dan jam ke-5 persentase edema mengalami penurunan secara bertahap menjadi 150,38% dan 106,82%.

Sedangkan pada ekstrak dosis III, persentase edema yang terbentuk di jam ke-1 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok lainnya, yaitu sebesar 146,02%, kemudian mengalami kenaikan pada jam ke-2 hingga jam ke-3 sebesar 200,38% dan 222,35%. Dan pada jam ke-4 hingga jam ke-5 mengalami penurunan menjadi 130,68% dan 71,97%. Penurunan persentase edema di setiap kelompok terjadi pada jam ke-4 dan jam ke-5, ini sesuai dengan pernyataan Huang *et al.*, (2012) yang menyatakan bahwa efek edema mencapai volume tertinggi pada 3 jam setelah diinduksi karagenan. Penurunan persentase edema tersebut juga dapat dilihat pada grafik di **Gambar 4.1** di bawah.



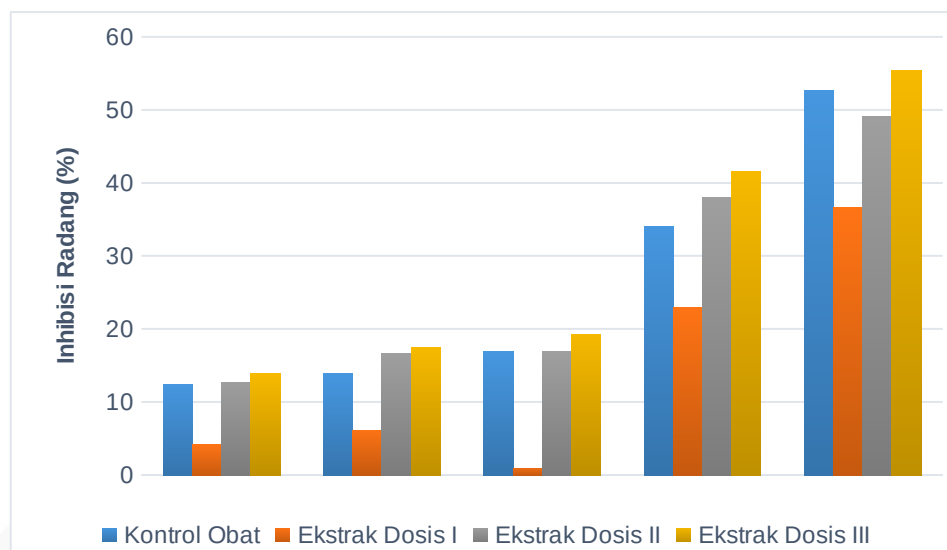
Gambar 4.1 Grafik Rerata Persentase Edema

Berdasarkan **Tabel 4.5** maupun grafik pada **Gambar 4.1** menunjukkan bahwa setiap perlakuan terjadi penurunan persentase edema. Dari data pada **Tabel 4.5**, kemudian dilakukan uji statistik ANOVA dan diperoleh hasil berbeda nyata dengan nilai $P < 0,05$ seperti yang ditunjukkan pada **Lampiran 12**, sehingga dilanjutkan dengan uji lanjut DMRT. Pengujian uji lanjut dilakukan antara pemberian perlakuan ekstrak daun sukun dengan 3 dosis yang berbeda, yaitu dosis 15 mg/20 g BB, 30 mg/20 g BB, dan dosis 60 mg/20 g BB. Pengujian uji lanjut DMRT dilakukan untuk mengetahui apakah pemberian ekstrak daun sukun dengan dosis yang berbeda dapat memberikan pengaruh yang nyata atau tidak terhadap persentase edema rata-rata hewan coba. Berikut adalah data hasil uji lanjut DMRT yang dapat dilihat pada **Tabel 4.6**.

Tabel 4.6 Uji Lanjut DMRT Rerata Edema yang Terbentuk pada Setiap Jam

Dosis (mg/20gBB)	Jam Ke- *				
	1	2	3	4	5
	%				
15	152,08 cd	206,63 ab	224,43 a	159,28 c	121,78 g
30	149,81 cd	204,73 ab	218,18 ab	150,38 cd	106,82 gh
60	146,02 e	200,38 ab	222,35 ab	130,68 ef	71,97 i

Keterangan: Data merupakan rerata dari 4 kali ulangan



Gambar 4.2 Inhibisi Radang Setiap Jam

Berdasarkan data pada **Tabel 4.6** menunjukkan bahwa rerata edema pada semua kelompok perlakuan mengalami penurunan persentase edema pada jam ke-4 dan jam ke-5. Hal ini sesuai dengan pernyataan Morris (2003) yang menyebutkan bahwa edema akan berkembang cepat 3 jam setelah induksi dan bertahan pada volume maksimal sekitar 5 jam setelah induksi.

Setelah induksi karagenan, terjadi respon yang menyebabkan edema terbagi dalam dua fase. Fase awal (*early phase*), menyebabkan trauma akibat radang yang ditimbulkan oleh karagenan. Trauma tersebut disebabkan oleh pelepasan histamin dan serotonin ke tempat radang serta terjadi peningkatan sintesis prostaglandin pada jaringan yang rusak. Kemudian pada fase kedua (*late phase*), terjadi pelepasan prostaglandin dan dimediasi oleh bradikinin, leukotrien, sel polimorfonuklear, dan diproduksi prostaglandin oleh makrofag. Pada fase kedua juga berhubungan dengan *Slow Reacting Substances* yang mencapai puncak pada 3 jam. Antara fase awal dan fase kedua, edema dipertahankan oleh kinin. (Chakraborty *et al.*, 2004).

Berdasarkan data pada **Tabel 4.6** dapat dilihat edema yang terbentuk antara kelompok dosis I (15 mg/20 g BB) dengan dosis II (30 mg/20 g BB) dan dosis III (60 mg/20 g BB) di jam ke-1 tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata, begitu pula pada jam ke-2 dan jam ke-3. Secara statistik persentase edema yang terbentuk pada kelompok perlakuan pemberian dosis I (15 mg/20g BB) ekstrak daun sukun antara jam ke-2 dan ke-3 tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata, begitu pula antara jam ke-2 dan jam ke-4. Sedangkan pada kelompok perlakuan pemberian dosis II (30 mg/20g BB) dan dosis III (60 mg/20g BB) terjadi perbedaan yang nyata antara jam ke-2 hingga jam ke-5.

Pada kelompok perlakuan pemberian dosis I (15 mg/20g BB) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata pada jam ke-2 dan jam ke-3. Perbedaan yang tidak nyata pada kelompok perlakuan dosis I di jam ke-2 dan ke-3 diduga karena pemberian ekstrak dengan dosis tersebut masih terlalu sedikit sehingga belum dapat memberikan pengaruh terhadap efek inflamasi pada mencit yang dikondisikan sakit. Edema yang terbentuk antara kelompok dosis I, dosis II dan dosis III di jam ke-4 hingga jam ke-5 menunjukkan adanya perbedaan yang nyata. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan dosis ekstrak daun sukun yang diberikan pada mencit memberikan pengaruh yang berbeda terhadap persentase edema, sehingga perbedaan dosis mempunyai efek antiinflamasi yang berbeda pula.

Aktivitas antiinflamasi ditunjukkan oleh persentase proteksi yang diberikan terhadap pembentukan edema untuk mengetahui persentase radang. Setelah dilakukan penghitungan persentase radang yang terbentuk, tahap selanjutnya adalah penghitungan nilai persentase inhibisi radang. Nilai persentase inhibisi radang menunjukkan kemampuan suatu bahan uji dalam menurunkan efek inflamasi atau bertindak sebagai suatu bahan antiinflamasi. Nilai persentase inhibisi radang didapatkan dengan membandingkan persen radang kontrol dengan persen radang kelompok uji. Persentase inhibisi radang rata-rata telapak kaki mencit dari jam ke-1 hingga jam ke-5 pada tiap perlakuan dapat dilihat pada **Tabel 4.7**.

Tabel 4.7 Rerata Persentase Inhibisi Radang

Perlakuan	Persentase Inhibisi Radang*
-----------	-----------------------------

	Jam Ke-1	Jam Ke-2	Jam Ke-3	Jam Ke-4	Jam Ke-5
Na-diklofenak	12,41	13,9	16,9	34,05	52,61
Dosis 15 mg/20 g BB	12,62	16,65	16,9	38,03	49,13
Dosis 30 mg/20 g BB	4,22	6,12	0,93	22,9	36,56
Dosis 60 mg/20 g BB	13,93	17,42	19,22	41,49	55,38

Keterangan: *Data merupakan rerata dari 4 kali ulangan

Nilai dari persentase inhibisi radang menunjukkan kemampuan dari suatu perlakuan tertentu dalam menurunkan radang. Persentase edema yang terbentuk dari keseluruhan pengamatan yaitu pada jam ke-1 sampai jam ke-5 pada kelompok kontrol obat lebih kecil dari persentase edema kontrol positif. Hal ini disebabkan karena pada kontrol positif tidak adanya agen antiinflamasi yang berperan dalam membantu menurunkan persentase edema yang terbentuk, sehingga edema terus mengalami peningkatan.

Berdasarkan data **Tabel 4.7** dapat dilihat bahwa persentase inhibisi radang pada kelompok perlakuan uji cenderung mengalami kenaikan dari jam ke-1 hingga jam ke-5. Pada perlakuan uji dengan pemberian obat antiinflamasi natrium diklofenak, persentase inhibisi radang terus mengalami peningkatan yang awalnya 12,41%, kemudian pada jam ke-2 dan jam ke-3 mengalami peningkatan menjadi 13,9% dan 16,9%, pada jam ke-4 terus meningkat dengan peningkatan yang cukup tinggi menjadi 34,05%, hingga pada jam ke-5 mengalami puncak persentase inhibisi radang yaitu 52,61%.

Ketiga kelompok yang diberi perlakuan dosis ekstrak daun sukun juga tampak mengalami kenaikan persentase inhibisi radang pada jam ke-1 hingga jam ke-5. Pada dosis I jam ke-3 persentase inhibisi radang mengalami penurunan dari 16,65% menjadi 16,9%, tetapi persentase inhibisi radang meningkat kembali pada jam ke-4 dan jam ke-5. Terjadinya penurunan inhibisi radang di jam ke-3 dapat disebabkan karena beberapa hal, salah satunya adalah pengkondisian mencit yang sulit pada saat pengukuran, hal ini memungkinkan adanya ketidaktepatan pada saat pengukuran. Pengukuran volume telapak kaki mencit menggunakan alat sederhana berupa spuit. Penggunaan spuit ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah volume air raksa yang digunakan, kejelasan tanda batas

agar kaki mencit terbenam dalam air raksa, posisi kaki mencit pada saat pengukuran, cara pembacaan skala yang dilakukan secara manual, dan sulitnya mengkondisikan hewan uji sehingga menimbulkan kesulitan pada saat pembacaan volume kaki mencit. Dalam pengkondisian mencit agar tenang saat pengukuran, sering mengalami kesulitan karena mencit cenderung menghentakkan kakinya sehingga sulit untuk melakukan pengukuran.

Adanya perbedaan besarnya nilai persentase inhibisi radang pada tiga kelompok dosis, dimana kelompok perlakuan ekstrak dosis III memiliki nilai persentase inhibisi radang lebih besar dibandingkan dengan kelompok perlakuan pemberian natrium diklofenak maupun ekstrak dosis I dan II. Ekstrak dosis I dan dosis II lebih rendah dari dosis III diduga karena dosis yang digunakan terlalu sedikit sehingga kurang efektif dalam menghambat edema yang terbentuk pada telapak kaki mencit. Pada perlakuan ekstrak dosis III, kenaikan persentase edema yang terbentuk setiap jam nya merupakan yang paling kecil dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Hal ini sesuai dengan data pada **Gambar 4.2** yang menunjukkan bahwa persentase inhibisi radang yang terbentuk pada kelompok dosis III mengalami kenaikan secara bertahap pada jam ke-1 sampai jam ke 5 setelah induksi. Sedangkan perbedaan nilai persentase inhibisi radang yang terjadi pada kelompok kontrol obat natrium diklofenak dengan kelompok ekstrak dosis III, dimana nilai persentase inhibisi radang pada kelompok ekstrak dosis III lebih besar daripada kelompok kontrol obat dapat disebabkan *duration of action* yang berbeda antara kontrol obat dengan ekstrak dosis III. *Duration of action* adalah rentang waktu antara timbulnya efek obat sampai saat efek hilang. *Duration of action* ekstrak dosis III lebih cepat absorbsinya daripada obat natrium diklofenak. Kecepatan absorpsi dari obat natrium diklofenak cenderung lebih lama daripada ekstrak dosis III dapat disebabkan formula dan proses pembuatannya yang berbeda. Dosis III ini diduga merupakan dosis yang paling tepat dalam pemberian ekstrak daun sukun untuk menurunkan efek inflamasi pada mencit yang dikondisikan mengalami inflamasi.

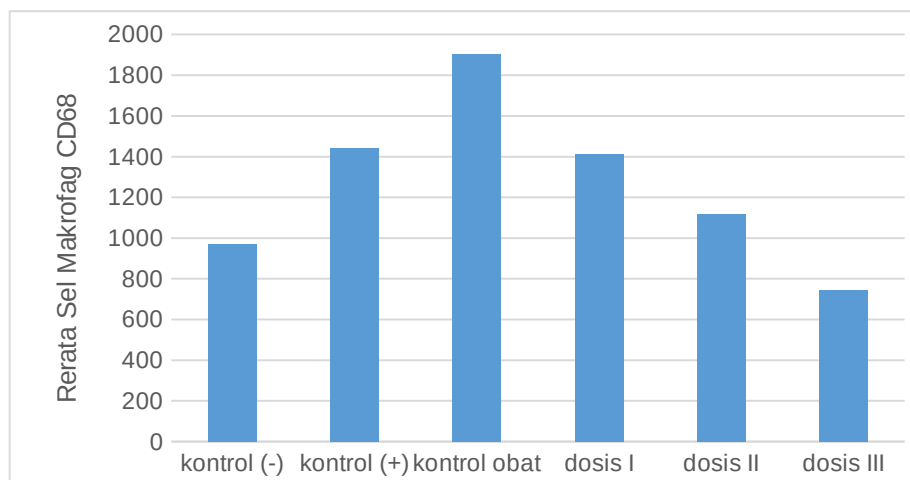
Adanya kemampuan menurunkan persentase edema diduga terjadi karena aktivitas senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak daun sukun. Flavonoid terutama bekerja pada endotelium mikrovaskular untuk mengurangi terjadinya hiperpermeabilitas dan edema. Flavonoid memiliki kemampuan memblok

siklooksigenase dan lipooksigenase asam arakhidonat sehingga sintesis PGE₂, leukotrien, histamin, bradikinin dan tromboksan terhambat. Adanya kemampuan flavonoid dalam menghambat sintesis mediator inilah yang berperan dalam mengurangi edema. Selain menghambat metabolisme asam arakhidonat, flavonoid juga menghambat sekresi enzim lisosom yang merupakan mediator inflamasi. Penghambatan mediator inflamasi ini dapat menghambat proliferasi dari proses radang (Sabir, 2007).

Senyawa fenolik juga mempunyai efek antiinflamasi yaitu dengan mengurangi peradangan, mekanismenya adalah dengan menstabilkan atau menetralkan radikal bebas. Proses peradangan akan melepaskan makrofag sebagai respon peradangan. Makrofag yang dilepaskan akan menghasilkan ROS yang akan memperbesar kerusakan jaringan dan meningkatkan rasa nyeri. ROS dapat dinetralkan dengan konsumsi antioksidan. Sifat antioksidan yang dimiliki oleh senyawa fenolik dapat menetralkan ROS. Penetralkan ROS akan menurunkan kerusakan jaringan dan mengurangi nyeri otot (Peake *et al.*, 2005).

4.3.2 Pengujian Kadar CD68 dan TNF- α dengan Metode *Flowcytometry*

Pada penelitian ini, pengujian metode *flowcytometry* dilakukan analisa dengan mengambil darah dari jantung mencit. Pengambilan darah dilakukan setelah pengamatan dan pengukuran edema kaki mencit pada jam ke-5 atau 5 jam setelah induksi karagenan. Pengujian dengan metode *flowcytometry* dilakukan untuk mengetahui kadar TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) dan makrofag CD68. Berikut adalah data hasil analisa kadar makrofag CD68 dan kadar TNF- α yang dihasilkan dapat dilihat pada **Gambar 4.3**.



Gambar 4.3 Jumlah Rerata Sel Makrofag CD68

Berdasarkan **Gambar 4.3** dapat dilihat bahwa pada kontrol negatif atau mencit yang dikondisikan tidak mengalami inflamasi, jumlah sel makrofag CD68 yang dihasilkan yaitu sebesar 9,695%. Sedangkan pada kontrol positif sebesar 14,41%, pada kontrol obat natrium diklofenak sel makrofag CD68 yang dihasilkan 19,04%, dosis I 14,107%, dosis II 11,16%, dan dosis III 7,46%. Berdasarkan grafik tersebut, jumlah sel makrofag CD68 pada kontrol obat yang memiliki nilai yang paling tinggi. Hal ini diduga karena pemberian obat natrium diklofenak yang merupakan obat AINS dapat merangsang makrofag CD68 dengan cepat sehingga menjadi lebih reaktif ketika terjadi inflamasi.

Dari data rerata jumlah sel makrofag CD68 tersebut kemudian dilakukan uji statistik ANOVA. Berdasarkan hasil perhitungan dengan taraf kepercayaan 95%, menyatakan bahwa adanya perlakuan yang diberikan pada pengujian sel makrofag CD68 terhadap mencit jantan memberikan pengaruh yang nyata, dimana nilai *P-value* lebih kecil dari $\alpha=0,05$. Hasil analisis ragam dapat dilihat pada **Lampiran 13**. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian perlakuan yang berbeda pada mencit yang diinduksi karagenan menghasilkan kadar CD68 yang berbeda pula. Kadar CD68 yang diukur pada masing-masing perlakuan merupakan hasil dari persen total PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*) yang telah diisolasi. PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*) atau sel darah mononucleated perifer adalah semua sel darah yang memiliki nucleus berbentuk bulat, seperti limfosit, monosit dan makrofag. Sel-sel darah ini merupakan komponen penting dari sistem kekebalan tubuh untuk melawan infeksi dan beradaptasi dengan zat asing.

CD68 adalah ekspresi dari sel makrofag yang merupakan hasil dari sel monosit yang berdiferensiasi. CD68 merupakan marker yang biasa digunakan untuk mendeteksi sel permukaan makrofag. Ketika mikroba masuk ke dalam tubuh, makrofag akan meresponnya dengan memproduksi protein terlarut yaitu sitokin. Salah satu sitokin yang dihasilkan adalah *tumor necrosis factor* (TNF) yang akan bereaksi pada endotel pembuluh darah kecil pada tempat infeksi. Hal ini akan mengakibatkan akumulasi leukosit pada sisi infeksi, dengan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas vaskuler sehingga terjadi inflamasi.

Kadar TNF- α yang dihasilkan pada pengujian dengan metode *flowcytometry* dapat dilihat pada **Tabel 4.8**.

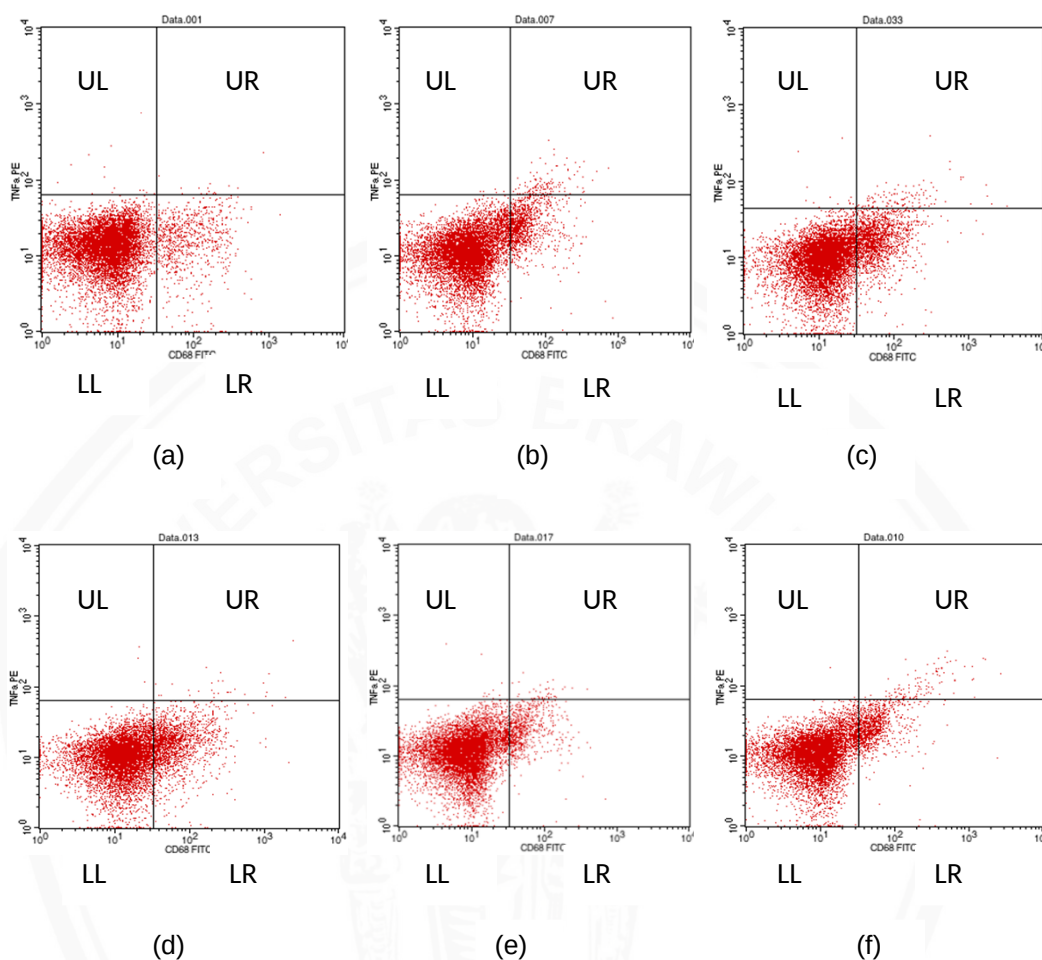
Tabel 4.8 Rerata Kadar TNF- α yang Dihasilkan Sel CD68

Kelompok Uji (mg/20 g BB)	Rerata TNF- α (%)*
Kontrol negatif	5,00 \pm 0,36
Kontrol positif	8,72 \pm 0,403
Kontrol obat	5,92 \pm 0,34
Dosis 1 (15 mg/20 g BB)	7,29 \pm 0,16
Dosis 2 (30 mg/20 g BB)	6,80 \pm 0,38
Dosis 3 (60 mg/20 g BB)	6,35 \pm 0,64

Keterangan: Data di atas menunjukkan nilai rata-rata persentase TNF- α \pm standart deviasi; $p < 0,05$

Berdasarkan data pada **Tabel 4.8** diatas, dapat diketahui bahwa kadar TNF- α pada kelompok kontrol negatif atau mencit yang dikondisikan tidak mengalami inflamasi paling kecil adalah sebesar 5,003%. Pada kelompok kontrol positif kadar TNF- α yang dihasilkan sebesar 8,72%, dan pada kelompok kontrol obat kadar TNF- α yang dihasilkan sebesar 5,92%. Sedangkan pada kelompok ekstrak dosis I, dosis II, dan dosis III adalah sebesar 7,29%, 6,35%, dan 6,803%. Data pada **Tabel 4.8** menunjukkan peningkatan ekspresi TNF- α pada setiap kelompok perlakuan akibat induksi karagenan yang mengaktivasi makrofag untuk menghasilkan sitokin yang menstimulasi inflamasi pada sel endotel dengan mensekresi sitokin sehingga

menyebabkan agregasi atau perpindahan dan aktivasi leukosit pada area inflamasi.



Keterangan:

- LL (Low Left) : Makrofag yang tidak terdeteksi CD68
- LR (Low Right) : Makrofag yang terdeteksi CD68 dan tidak menghasilkan TNF- α
- UR (Up Right) : Makrofag yang terdeteksi CD68 dan menghasilkan TNF- α
- UL (Up Left) : Makrofag yang tidak terdeteksi CD68

Gambar 4.4 Grafik representasi pengujian CD68 dan TNF- α menggunakan alat Flowcytometer, Kelompok kontrol negatif (a), kontrol positif (b), kontrol obat (c), perlakuan ekstrak dosis I (d), perlakuan dosis II (e), perlakuan dosis III (f)

TNF- α ditemukan meningkat pada kondisi inflamasi akut dan kronis, seperti trauma, sepsis, infeksi, arthritis rematoid, dan dislipidemia. TNF- α memegang peranan penting pada proses ini, dan kemungkinan menjadi target potensial untuk terapi. Penelitian pada agen-agen yang dapat menghambat TNF- α menunjukkan bahwa hambatan tersebut mampu memperbaiki profil lipid pada pasien dengan penyakit inflamasi kronis (Popa *et al.*, 2007).

Hasil uji ANOVA pada **Lampiran 13** menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan dalam produksi TNF- α ($p < 0,05$). Dapat dilihat pada **Tabel 4.8** data yang diperoleh masing-masing kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan persentase TNF- α . Adapun kadar TNF- α yang paling tinggi adalah pada kelompok kontrol positif. Hal ini disebabkan pada kelompok kontrol positif, mencit yang diinduksi karagenan tidak diberi perlakuan apapun sehingga tidak ada rangsangan dari obat atau senyawa kimia untuk mengurangi ekspresi TNF- α yang terbentuk. Sedangkan pada kelompok perlakuan ekstrak daun sukun, kadar TNF- α pada ekstrak dosis III lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak dosis I dan dosis II. Lebih rendahnya persentase TNF- α kelompok ekstrak dosis III diduga karena dosis yang digunakan dirasa cukup dalam menghambat ekspresi TNF- α , serta kemampuannya dalam menghambat edema lebih besar daripada dosis I dan dosis II. Dengan rendahnya persentase TNF- α pada dosis III, diduga dosis III merupakan dosis yang paling tepat dalam pemberian ekstrak daun sukun untuk menghambat ekspresi TNF- α , dimana TNF- α adalah salah satu sitokin pro-inflamasi.

Mueller (2005) mengemukakan bahwa efek antiinflamasi flavonoid juga dapat disebabkan oleh aksinya dalam menghambat akumulasi leukosit di daerah inflamasi. Pada kondisi normal leukosit bergerak bebas sepanjang dinding endotel. Selama inflamasi, berbagai mediator turunan endotel dan faktor komplemen mungkin menyebabkan adhesi leukosit ke dinding endotel sehingga menyebabkan leukosit menjadi immobil dan menstimulasi degranulasi netrofil. Sehingga dikatakan bahwa pemberian flavonoid dapat menurunkan jumlah leukosit immobil dan mengurangi aktivasi komplemen sehingga menurunkan adhesi leukosit ke

endotel dan mengakibatkan penurunan respon inflamasi tubuh (Njiveldt *et al.*, 2001).

Selain itu dalam fungsinya sebagai antiinflamasi flavonoid dapat menghambat degranulasi netrofil, sehingga secara langsung mengurangi pelepasan asam arakhidonat oleh netrofil. Flavonoid juga menghambat pelepasan histamin (antihistamin). Histamin adalah salah satu mediator inflamasi yang pelepasannya distimulasi oleh pemompaan kalsium ke dalam sel (Njiveldt *et al.*, 2001). Njiveldt *et al.* (2001) melaporkan bahwa flavonoid dapat menghambat pelepasan histamin dari sel mast. Mekanisme yang tepat belum diketahui, namun Mueller (2005) menduga bahwa flavonoid dapat menghambat enzim c-AMP fosfodiesterase sehingga kadar c-AMP dalam sel mast meningkat, dengan demikian kalsium dicegah masuk ke dalam sel yang berarti juga mencegah pelepasan histamin.

Efek flavonoid sebagai antioksidan secara tidak langsung juga mendukung efek antiinflamasi flavonoid. Adanya radikal bebas dapat menarik berbagai mediator inflamasi (Halliwell, 1995 dalam Njiveldt *et al.*, 2001). Korkina (1997) dalam Njiveldt *et al.*, (2001) menambahkan bahwa flavonoid dapat menstabilkan Reactive Oxygen Species (ROS) dengan bereaksi dengan senyawa reaktif dari radikal sehingga radikal menjadi inaktif.

V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Hasil pengujian aktivitas antiinflamasi secara *in vivo* pada mencit jantan yang dikondisikan inflamasi menggunakan 0,1 ml karagenan 1% diberi ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) mampu menurunkan aktivitas inflamasi.
2. Penggunaan dosis ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) pada pengujian *in vivo* menggunakan 3 dosis yaitu 15 mg/20 g BB, 30 mg/20 g BB, dan 60 mg/20 g BB diperoleh dosis optimal yang mampu menurunkan inflamasi pada mencit adalah dosis 60 mg/20 g BB.
3. Pada pengujian aktivitas antiinflamasi secara *in vivo* efektifitas ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) dibandingkan natrium diklofenak, ekstrak dosis 15 mg/20 g BB dan 30 mg/20 g BB memiliki efektifitas yang rendah daripada natrium diklofenak. Sedangkan pada dosis 60 mg/20 g BB efektifitas penurunan inflamasinya hampir sama dengan natrium diklofenak.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk analisa senyawa bioaktif lainnya yang terkandung dalam ekstrak daun sukun (*Artocarpus altilis* (Park.)) yang dapat berpotensi sebagai agen antiinflamasi.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk analisa aktivitas antiinflamasi pada uji edema menggunakan plethysmometer digital sehingga diharapkan hasil yang didapat lebih akurat.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menambahkan pengujian laboratorium terhadap biomarker peradangan, yaitu prostaglandin dan leukotrien serta deteksi sitokin dan *Cluster of differences* yang lebih bervariasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. 2005. **Cellular and Molecular Immunology**. Edisi Kelima. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Abrams, G.D. 1995. **Respon Tubuh Terhadap Cedera**. Dalam S.A. Price & L.M. Wilson, Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit (4th ed.)(pp.25-61)(Anugerah, P., penerjemah). Jakarta: EGC.
- Andriani, Ani. 2013. **Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etil Asetat Daun Sukun (*Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg) Melalui Penghambatan Migrasi Leukosit Pada Mencit yang Diinduksi Thioglikolat**. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Apriani, D.R. 2011. **Uji Efek Antiinflamasi Kombinasi Ekstrak Air Akar Tanaman Akar Kucing (*Acalypha indica* Linn) dan Ekstrak Etanol 70% Rimpang Jahe Merah (*Zinger officinate* Rosc.) terhadap Edem Telapak Kaki Tikus yang diinduksi Karagenan**. Hasil Skripsi. FMIPA. Universitas Indonesia.
- Apsari, P.D. 2011. **Perbandingan Kadar Fenolik Total Ekstrak Metanol Kelopak Merah dan Ungu Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*, Linn) Secara Spektrofotometri**. ISBN:978-979-18458-4-7.
- Arditiana, Ayu., Nia Rochmawati, Puruhito Widinugroho, Reny Dwi Puspitasari, Tri Dewanti Widyaningsih. 2015. **Suplemen Cincau Hitam dan Daun Bungur untuk Kolesterol, Hipertensi, dan Diabetes**. Jurnal Pangan dan Agroindustri 3(1):166-173.
- Arung, E.T., Wicaksono, B.D., Handoko, Y.A., Kusuma, I.W., Yulia, D., & Sandra, F., 2009. **Anti-Cancer Properties of Diethylether Extract of Wood from Sukun (*Artocarpus altilis*) in Human Breast Cancer (T47D) Cells**. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 8(4), 317-324.
- Astawan, M. 2004. **Seri Gaya Hidup Sehat SENIOR : Kandungan Gizi Aneka Bahan Makanan**. PT Gramedia. Jakarta.
- Awang, D.V.C. 2009. **Tyler's Herbs of Choice : The Therapeutic Use of Phytomedicinals, 3rd Ed., 2-5**. CRC Press. Boca Raton.
- Baratawidjaja KG. 2004. **Imunologi dasar**. Edisi keenam. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

- Brown, M., Wittwer, C. 2000. **Flow Cytometry; Principles and Clinical Application in Hematology**. Clinical Chemistry, 2000, 46:8(B).
- Cameron, D.K dan Wang, Y. 2006. **Application of Protease and High-Intensity Ultrasound in Corn Strach Isolation from Demerged Corn Flour**. Journal Food Sciece University of Arkansas. 83:505-509.
- Chakraborty, A., R.K.B. Devi, S. Rita, Kh. Sharatchandra, and Th. I. Singh. 2004. **Preliminary Studies on Antiinflammatory and Analgesic Activities of Spilanthes acmellain Experimental Animal Model**. Indian Journal Pharmacology 36 (3) : 148-150.
- Contran, R.S., Mitchell, R.N. 2007. **Inflamasi Akut dan Kronik**. Dalam: Kumar V., Contran, R.S., Robbin, S.I. (Eds) Buku Ajar Patologi Robbins, Ed 7, vol 1. Jakarta: EGC.
- Cook, N. C. and S. Samman. 1996. **Review Flavonoids-Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effect, And Dietary Sources**, J. Nutr. Biochem (7): 66-76.
- Coronel, R.E., 1983. **Rimas and Kamansi Promising Fruits of the Philippines, 379-396**. College of Agriculture, University og the Philippines, Los Banos.
- Corsini, E., Paola R.D., Viviani B., Genovese, T., Mazzon, E., Lucchi, Galli, C.L., dan Cuzzorcrea, S. 2005. **Increased Carragenan-Induced Acute Lung Inflammation in Old Rats**. Journal Immunology 115(2): 253-261.
- Corwin, Elizabeth J. 2008. **Handbook of Parthophysiology SPSS**. Depok: Departemen Biostatistika Fakultas Kesehatan Masyarakat UI, 23-30, 58-64.
- Coussens L.M., Werb Z. 2002. **Inflammation and Cancer**. Nature. 420:860-7.
- Cruise, Julius M., Lewis, R. 1991. **Atlas of Immunologi**. CRC Press. New York.
- Dalam P, Ayu S. D. 2012. Uji Efek Antiinflamasi Ekstrak Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomea batatas* L.) Pada Telapak Kaki Tikus Strain Wistar (*Rattus novergicus*) yang Diinjeksi Karagenan. Hasil Skripsi. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya.
- Cuppet, S., M. Schrepf and C. Hall III. 1954. **Natural Antioxidant – Are They Reality**. Dalam Foreidoon Shahidi: Natural Antioxidant, Chemistry, Health Effect and Applications, AOCS Press, Champaign, Illinois: 12-24.
- Dai, Y., L.M. Chu, Y.P. Chan, and P.P.H. But. 2005. **Inhibitory Effects of Selaginella tamariscina on Immediate Allergic Reactions**. The American Journal of Chinese Medicine, Vol. 33, No. 6, 957–966.

- Darma, Jelantik. 2013. **Pengaruh Pemberian Ekstrak Kering Daun Sukun (*Artocarpus altilis*) terhadap Kadar Glukosa Darah pada Tikus Putih Diabetes Melitus**. Universitas Udayana. Bali.
- Darwis, D. 2000. **Teknik Dasar Laboratorium Dalam Penelitian Senyawa Bahan Alam Hayati**. Workshop Pengembangan Sumber Daya Manusia Dalam Bidang Kimia Organik Bahan Alam Hayati FMIPA Universitas Andalas. Padang.
- Eales, L.J. 2003. **Imunology for Life Scientist Chichester**. Jhon Wiley & Sons Ltd. P.94-96.
- Dalam P, Ayu S. D. 2012. Uji Efek Antiinflamasi Ekstrak Daun Ubi Jalur Ungu (*Ipomea batatas L.*) Pada Telapak Kaki Tikus Strain Wistar (*Rattus novergicus*) yang Diinjeksi Karagenan. Hasil Skripsi. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya.
- Fajriani. 2008. **Pemberian Obat-obatan Anti Inflamasi Non Steroid (AINS) pada Anak**. Indonesian Journal of Dentistry, 15 (3): 200-204.
- Fajriani. 2008. **Pemberian Obat-obatan Anti Inflamasi Non Steroid (AINS) pada Anak**. Indonesian Journal of Dentistry, 15 (3): 200-204.
- Firdaus, M.T., A. Izam, and R.p. Rosli. 2010. **Ultrasonic-Assisted Extraction of Treterpenoid Saponins from Mangrove Leaves**. The 13th Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress. Taipei. 1-8.
- Furst, Danile E., Munster, Tino. 2002. **Obat-obatan Antiinflamasi Nonsteroid, Obat-obat Atireumatik Pemodifikasi Penyakit, Analgesik Nonopioid dan Obat-obat untuk Pirai**. Dalam: Katzung B.G., editor. Farmakologi Dasar dan Klinik. Edisi 8. Jakarta: Salemba Medika. H 449-460.
- Gautam, R., Sanjay, M. J. 2009. **Recent Developments in Anti Inflammatory Natural Products**. Med Res Rev, (29(5), 767-820.
- George, S., P. Brat, P. Alter, and M.J. Amiot. 2005. **Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products**. J. Agric. Food Chem. 53(5):1370-1373
- Gulcin, L., Uguz, M. T., Oktay M., Beydemir, S., and Kufrevioglu, O.I. 2004. **Evaluation of The Antioxidant and Antimicrobial Activities of Clary Sage (*Savia sclarea L.*)**. Turk I. Agric. For. 28:25-33.

- Gurenlian, JoAnn R. 2006. **Inflammation : The Relationship Between Oral Health and Systemic Disease**. Diakses Pada 1 Januari 2012. http://www.adha.org/downloads/sup_inflammation.pdf.
- Hadriyono, Kukuh R.P. 2011. **Karakter Kulit Manggis, Kadar Polifenol dan Potensi Antioksidan Kulit Manggis (*Garciana mangostana* L.) pada Berbagai Umur Buah dan Setelah Buah Dipanen**. Skripsi.
- Hafeez, Abdul, *et al.* 2013. **Evaluation of Carrageenan Induced Anti-inflammatory Activity of Ethanolic Extract of Bark of *Ficus virens* Linn. In Swiss Albino Mice**. Journal of Phytopharmacology, 2(3): 39-43.
- Halliwell B, Gutteridge JM. **The Definition and Measurement of Antioxidants in Biological Systems**. Free Radic Biol Med. 1995. 18(1):126-126.
- Hamor, G.H. 1996. **Zat Anti Radang Non Steroid**. Gajah Mada University Press. Halaman 1096-1097.
- Harmanto, Ning. 2012. **Daun Sukun: Si Daun Ajaib Penakluk Aneka Penyakit**. PT. AgroMedia Pustaka. Jakarta.
- Hembing. 2008. **Produksi Antibodi Poliklonal Peanut Stripe Virus**. Jurnal Bioteknologi Pertanian. 10(2) pp. 39-44. Institut Pertanian Bogor.
- Huang, G.J, *et al.* 2012. **Anti-inflammatory Activities of Aqueous Extract of *Mesona procumbens* in Experimental Mice**. Journal of Science and Food Agricultural. 92:1186-1193.
- Intansari, S.I., Triyono, T., Mulyono, B. 2003. **Aplikasi Flow Cytometry di laboratorium Klinik. Berkala Kesehatan Klinik**. Vol. IX, No.2.
- Juliani, H.R. dan J.E. Simon. 2002. **Antioxidant Activity of Basil, IN. Trends in New Crops and New Uses**. J. Janick and A. Whipkey (eds) p.575-579. ASHS Press, Alexandria, VA.
- Jun, M., H.Y. Fu, J. Hong, X. Wang, C.S. Yang, and C.T. Ho. 2006. **Comparison of Antioxidant Activities of Isoflavones from Kudzu Root (*Pueraria lobata* ohwi)** The Journal of Food Science. Institute of Technologist. 68:2117-2122.
- Karthikumar, S., Vigneswari, K., and Jegatheesan, K. 2007. **Screening of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Leaves of *Eclipta prostrata* (L)**. Scientific Research and Essay 2 (4):101-104.

- Katzung, Bertram G. 2004. **Farmakologi Dasar dan Klinik Edisi 4**. Alih bahasa : Staf Dosen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya. Jakarta : EGC.
- Katzung, B.G., Payan, D.G. 2002. **Obat antiinflamasi nonsteroid; analgesik nonopioid; obat yang digunakan pada gout**. Dalam B. G. Katzung, *Farmakologi dasar dan klinik* (6th ed.)(pp.558-582). Jakarta: EGC.
- Kiessoun K., Souza A., Meda N.T.R., Coulibaly A.Y., Kiendrebeogo M., Lamien-Meda A., Lamidi m., Millogo Rasolodimby J., Nacoulma O.G. 2010. **Polyphenol Contents, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Six Malvaceae Species Traditionally used to Treat Hepatitis B in Burkina Faso**. European Journal of Scientific Research, 44(4):570-580.
- Kikuzaki, H., M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyana. H. Taniguchi. 2002. **Antioxidant Properties Ferulic Acid and Its Related Compound**. J.Agric Food Chem 50
- Korkina, Ludmila. 1997. **Mechanism of Chelating and Antioxidant Activity of Metal-Rutin Complexes**. Vitamin Research Institute.
- Ko, H. H., Lu, Y. H., Yang, S. Z., Won, S. J., dan Lin, C. N., 2005. **Sytotoxic Prenylflavonoids from *Artocarpus elasticus***, J. Nat. Prod., 68,1692-1695.
- Kuldiloke, J. 2002. **Effect of Ultrasound, Temperature and Pressure Treatments on Enzyme Activity and Quality Indicators of Fruit and Vegetable Juices**. Dissertationder Technischen Universität Berlin. Berlin.
- Kusumawati, D. 2004. **Bersahabat Dengan Hewan Coba**. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Lailatul, Yulina. 2015. **Optimasi Waktu Ekstraksi Bahan Baku Pembuatan Suplemen Kapsul Berbasis Cincau Hitam (*Mesona palustris BL.*) Skala Pilot Plantdi PT. ASIMAS Lawang-Jawa Timur**. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Lee, H.S. 2000. **HPLC Analysis of Phenolic Compounds**. Di dalam: Nollet, L. M. I. (Ed.). Food Analysis by HPLC, Second Edition, Revised and Expanded . Marcell Dekker, Inc., New York.
- Lelo, A. 2005. **NSAIDS: Friend or Foe**. Journal of teh Indonesia Dental Association. Makassar.

- Li, S, R. Zhu, M. Zhong *et al.* 2010. **Effects of Ultrasonic-Assistant Extraction Parameters on Total Flavones Yield of *Selaginella doederleinii* and its Antioxidant Activity.** Journal of Medicinal Plants Research, Vol.4, No.17, pp. 1743-1750.
- Lin, K. W., Liu, C. H., Tu, Y.H., Ko, H.H., dan Wei, B.L. 2009. **Antioxidant Prenylflavonoids from *Artocarpus communis* and *Artocarpus elaticus*.** Food Chem., 115, 558-562.
- Macheix, J.J., Fleuriot, A., and Billot, J. 1990. **Fruit Phenolic (pp.1-126).** Boca Raton, FL: CRC Press.
- Mai, N.T.T., Hai, N.X., Phu, D.H., Trong, P.N.H. & Nhan, N.T. 2012. **Three New Geranyl Autones from The Leaves of *Artocarpus altilis*,** Phytochemistry Letters, 5, 647-650.
- Massal, E., & Barrau, J. 1954. **Pacific Subsistence Crops: Breadfruit.** South Pacific Bull, 4(4), 24-26.
- Maulida, D. 2010. **Ekstraksi Antioksidan (Likopen) dari Buah Tomat dengan menggunakan Solven Campuran, n-heksana, aseton, dan etanol.** Universitas Diponegoro. Semarang.
- Meot-Duros L and Magne C. 2009. **Antioxidant Activity and Phenol Content of *Crithmum maritimum* L. Leaves.** Plant Physiol Biochem. 47(1); 37-41.
- Middleton, E., Kandaswami., Theoharis. 2000. **The Effect of Plant Flavonoids on Mamlian Cells: Implication for Inflammation, Heart Disease & Cancer.** Pharmacological Reviews, 52 (4), 711-722.
- Molineux, P. 2004. **The Use of The Stable Free Radical Diphenyl Picrylhydrazil (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity.** Songklanakarin J. Sci. Technol., 26 (2), 211-219.
- Morris, Christopher J. 2003. **Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat and Mouse.** In P.G Winyard and D.A Willoughby (Ed). Methods in Molecular Biology, Vol 225; Inflammation Protocols (pp. 115-121). Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Mueller, J. 2005. **Bioflavonoids: Natural Relief for Allergies and Asthma.** www.worldwidehealthcenter.net/articles-336.html (1 Agustus 2015).

- Njiveldt R.J., E. van Nood, D.E.C. van Hoon, P.G. Boelens, K. van Norren, P.A.M. van Leeuwen. 2001. **Flavonoids; A Review of Probable Mechanism of Action and Potential Applications 1-3**. Am J Clin Nutr; 74:418-25.
- Novak, I., P. Janeiro, M. Seruga, dan A.M. Oliveria-Brett. 2008. **Ultrasound Extracted Flavonoids from Four Varieties of Portuguese Red Grape Skins Determined by Reverse-phase High-performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection**. Analytica Chimica Acta 630: 107-115.
- Nugroho A, Harijanto PN, Datau EA. 2000. **Imunoligi pada Malaria**. Dalam: Harijanto PN, editor. Malaria Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis & Penanganan. Jakarta; EGC:128-47
- Ayu S.D.P. 2012. **Uji Efek Antiinflamasi Ekstrak Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomea batatas L.*) Pada Telapak Kaki Tikus Strain Wistar (*Rattus novergicus*) yang diinjeksi Karagenan**. Hasil Skripsi. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya.
- Patel, S. & Celermajer, D.S. 2008. **Atherosclerosis: Underlying Inflammatory Mechanisms and Clinical Implications**. Int.J. Biochem. Cell Biol., 40(4): 576-580.
- Peake J, Nosaka K, Suzuki K. 2005. **Characterization of Inflammatory Responses to Eccentric Exercise in Humans**. (Dikutip 15 Juli 2015); (22 Halaman).
- Pearson, W. 2005. **Bioflavonoids**. www.equinecentre.com.au/health_neutraceuticals_bioflavonoids.shtml (10 Januari 2016).
- Peres, V.L., J. Saffia, M.I.S. Melecchi, F.C. Abadc, R.A Jacques, M.M. Martinez, E.C. Oliveira, and E.B. Caramao. 2006. **Comparison of Soxhlet, Ultrasoundassisted and Pressurized Liquid Extraction of Terpenes, Fatty Acids and Vitamin E from Piper gaudichaudianum Kunth**. Journal of Chromatography A 1105: 115-118.
- Plebanski M, Proudfoot O, Pouniotis D, Coppel RL, Apostolopoulos V, Flannery G. 2002. **Immunogenetics and the Design of *Plasmodium falciparum* vaccines for use in Malaria-Endemic Populations**. J. Clin. Invest; 110 (3): 295-301.

- Prakash, Aruna., Fred Rigelhof, and Eugene Miller. 2001. **Antioxidant Activity**. Medallion Laboratories Analytical Progress: Minnesota. www.medlabs.com/downloads/Antioxacti.pdf
- Price, S.A dan Wilson, L.M. 2005. **Patofisiologi Konsep Klinik Proses-Proses Penyakit**. Ed 4. EGC. Jakarta. Hal 35-50. Dalam Fridiani, D. 2012. Uji Antiinflamasi Ekstrak Umbi Rumpun Teki (*Cyperus rotundus* L.) pada Kaki Tikus Wistar Jantan yang diinduksi Karagenan. Hasil Skripsi. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Ragone, D., 1997. **Breadfruit *Artocarpus altilis*. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops, 10**, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Roma.
- Rahman, M. 2014. **Introduction to Flow Cytometry**. Bio-Rad Company. Endeavour House, Kidlington, Oxford OX5 1GE, UK.
- Ramadhani, Ahmad. 2009. **Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Sukun (*Artocarpus altilis*) terhadap Larva *Artemia salina* leach Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BST)**. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang.
- Raman, V., Sudhakar, D., & Anandarajagopal. K. 2012. **Preliminary Phytochemical Investigation and Screening Antimicrobial Activity of Leaf Extract of *Artocarpus altilis***, Asian J. Biol. Life Sci., 1(2), 104-107.
- Robert, L.J. & Morrow, J.D. 2001. **Senyawa Analgetik-antipiretik dan Antiradang serta Obat-Obat yang digunakan dalam Penanganan Pirai**. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Robbins, Stanley dan Vinay, Kumar. 2005. **Buku Ajar Patologi Edisi 4**. Alih Bahasa Staf Pengajar Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Jakarta: EGC.
- Robinson, Traver. 1995. **Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi**. Dalam Harimukti I. 2003. Kandungan Saponin dan Flavonoid pada Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) Akibat Perebusan Bersama Daun Singkong (*Manihot ultissima*). Hasil Skripsi. IKIP PGRI. Semarang.
- Rohmatussolihat. 2009. **Antioksidan, Penyelamat Sel-sel Tubuh Manusia. Jurnal Biotrends**. 4(1):5-9.

- Ross, J.A. and C.M. Kasum. 2002. **Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety**. Annual Reviews in Nutrition 22:19-34.
- Rowe, Raymond C., Paul J Sheskey, dan Marian Quinn. 2009. **Handbook of Pharmaceutical Excipients Sixth Edition**. Pharmaceutical Press. London. Hal 122-125.
- Rustam, E, Atmasari, I, Yanwirasti. 2007. **Efek Anti Inflamasi Ekstrak Etanol Kunyit (*Curcuma domestika* Val.) Pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar**. Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi. 12 (2) : 112-115.
- Sabir, Ardo. 2007. **Pemanfaatan Flavonoid di Bidang Kedokteran Gigi**. Maj.KG Dental Journal Edisi Khusus Temu Ilmiah Nasional III. Surabaya: Airlangga University Press. Vol.38:135-141.
- Santos JD, Krug FJ, Pereira Korn M. 2006. **Currents on Ultrasoundassisted Extraction for Sample Preparation and Spectroscopic Analytes Determination**. Appl. Spectrosc. Rev., 41:305-321.
- Selmi, S., dan S. Sadouk. 2008. **The Effect of Natural Antioxidant (*Thymus vulgaris* (Linnaeus)) Onflesh Quality of Tuna (*Thunnus thynnus* (Linnaeus)) during Chilled Storage**. Pan-American Journal of Aquatic Sciences 3(1): 36-45.
- Setiati,T.E. 2004. **Faktor Hemistasis dan Faktor Kebocoran Vaskuler sebagai Faktor Diskriminan untuk Memprediksi Syok pada Demam Berdarah Dengue**. (Disertasi). Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Shabella, R. 2012. **Terapi Daun Sukun Dahsyatnya Khasiat Daun Sukun Untuk Menumpas Penyakit**. Klaten: Cable Book.
- Shahwar, D., et al. 2010. **Antioxidant Activities of the Selected Plants from the Family Euphorbiaceae, Lauraceae, Malvaceae and Balsaminaceae, African**. Journal of Biotechnology. 9(7): 1086-1096.
- Sherwood, L. 2002. **Fisiologi Manusia : Dari Sel ke Sistem**. Beatrica I Santoso Ed. EGC. Jakarta. Hal 369-371. Dalam P, Ayu S. D. 2012. Uji Efek Antiinflamasi Ekstrak Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomea batatas* L.) Pada Telapak Kaki Tikus Strain Wistar (*Rattus novergicus*) yang Diinjeksi Karagenan. Hasil Skripsi. Fakultas Kedokteran. Univesitas Brawijaya.
- Siddesha, J.M., Angaswamy, N., & Vishwanath, B.S. 2011. **Phytochemical Screening and Evaluation of In Vitro Angiotensin-Converting Enzyme**

- Inhibitory Activity of *Artocarpus altilis* Leaf.** Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, 25 (20), 1931-1940.
- Singh, Amritpal., S. Maholtra. Dan R. Subban. 2008. **Antiinflammatory and Analgesic Agents from Indian Medicinal Plants.** International Journal of Integrative Biology, 3 (1), 57-72.
- Soni, M., K. Patidar, D. Jain, dan S. Jain. 2010. **Ultrasound Assisted Extraction (UAE): A Novel Extraction Technique for Extraction of Nutraceuticals from Plants.** Journal of Pharmacy Research 3 (3): 636-638.
- Suralkar, Aupama A. 2008. **In-vivo Animal Models for Evaluation of Antiinflammatory Activity.** Vol 6, Article Review, Issue 2.
- Tjay, T.H dan Rahardja, K. 2002. **Obat-obat Penting : Khasiat, Penggunaan, dan Efek-Efek Sampingnya.** Edisi VI. Jakarta: Penerbit PT. Elex Media Komputindo.
- Utami, Prapti. 2013. **The Miracle of Herbs.** Agromedia. Jakarta.
- Vinegar, Ralph., Risley, Edwin A., dan Nuss, George W. 2004. **Quantitative Studies of the Pathway to Acute Carrageenan Inflammation.** Federation Proceedings. Vol. 35 No. 13.
- Wang, Y., Deng, T., Lin, L., Pan, Y. And Zheng, X., 2006. **Bioassay-guided isolation of antiatherosclerotic phytochemicals from *Artocarpus altilis*,** Phytoter. Res., 20, 1052-1055.
- Wang, Y., Xu, K., Lin, L., Pan, Y., & Zheng, X., 2007. **Geranyl flavonoids from the leaves of *Artocarpus altilis*.** Phytochemistry, 68, 1300-1306.
- Weng, J.R., Chan, S.C., Lu, Y. H., Lin, H. C., Ko, H.H., & Lin, C.N. 2006. **Antiplatelet Prenylflavonoids from *Artocarpus communis*.** Phytochemistry, 67, 824-829.
- Wilmana, P. F. 1995. **Analgesik antipiretik antiinflamasi nonsteroid dan obat nyeri.** Dalam: Ganiswara, S. G.(ed.).*Farmakologi dan Terapi.* Edisi ke-4. Jakarta: Penerbit Gaya Baru.
- Winarno. 2004. **Kimia Pangan dan Gizi.** PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Winter, CA., Risley EA dan Nuss, GW. 1962. **Carrageenin-Induced Udder Inflammation in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs.** Journal Proc.Soc. Exp. Biol. Med. 111, 544-554.

- Wirakusumah, E.P. 2009. **Buah dan Sayur Sumber Antioksidan Khususnya Polyphenol**. Seminar Food-Polyphenol (Forever Young with Antioxidant-Polyphenol) dengan Tema Buah. Balai Kota Bogor, Bogor.
- Zakaria, Z. A., Mohamed, A.M., Jamil, N.S. M., *et al.* 2011. **In Vitro Antiproliferative and Antioxidant Activity of the Extract of Muntingia Calabura Leaves**. The America Journal of Chinese Medicine. 39(1):183-200.

